

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年1 月15 日 (15.01.2004)

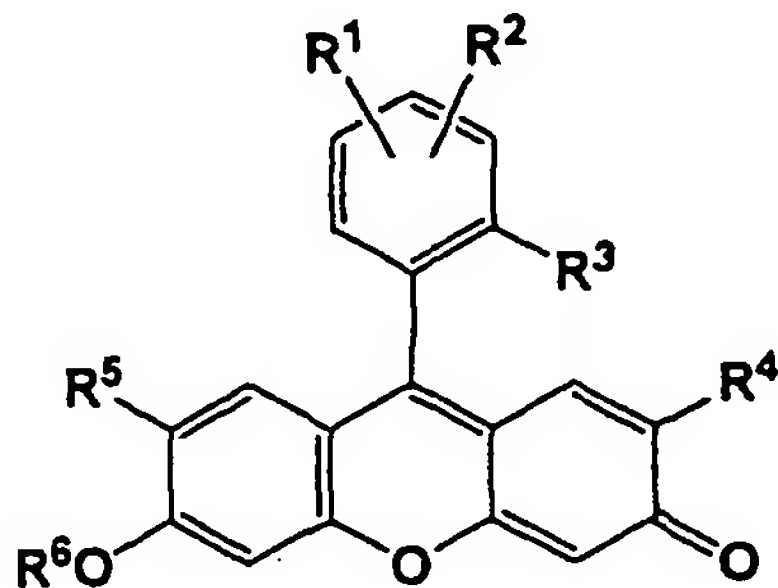
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/005917 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 31/00, 21/78 [JP/JP]; 〒350-1175 埼玉県 川越市 笠幡 1 8 5 6-1 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008585
- (22) 国際出願日: 2003 年7 月7 日 (07.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-198197 2002 年7 月8 日 (08.07.2002) JP
特願2003-20295 2003 年1 月29 日 (29.01.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都 中央区 日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 長野 哲雄 (NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒167-0032 東京都 杉並区 天沼 1-2 8-1 5 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浦野 泰照 (URANO, Yasuteru) [JP/JP]; 〒213-0013 神奈川県 川崎市 高津区 末長 4 9 8 ドミール 梶ヶ谷 2 0 4 Kanagawa (JP). 見目 勝 (KENMOKU, Suguru) [JP/JP]; 〒170-0001 東京都 豊島区 西巢鴨 2-3 1-7 東大豊島学寮 Tokyo (JP). 神田 耕二郎 (KANDA, Kohjiro)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: 蛍光プローブ



(I)

(57) Abstract: A fluorescent probe represented by the following formula (I): (I) wherein R¹ and R² each represents hydrogen, a substituent for trapping a proton, metal ion, or active oxygen species, etc.; R³ represents a monovalent substituent; R⁴ and R⁵ each represents hydrogen or halogeno; and R⁶ represents hydrogen, alkylcarbonyl, or alkylcarbonyloxymethyl; provided that R¹, R², and R³ are selected in such a combination that (1) before the trapping of, e.g., a proton, R¹, R², and R³ give a substantially high electron density to the benzene ring to which they are bonded, in order that the compound represented by the formula (I) be substantially nonfluorescent and that (2) after the trapping of, e.g., a proton, R¹, R², and R³ substantially reduce the electron density of the benzene ring to which they are bonded, in order that the compound resulting from

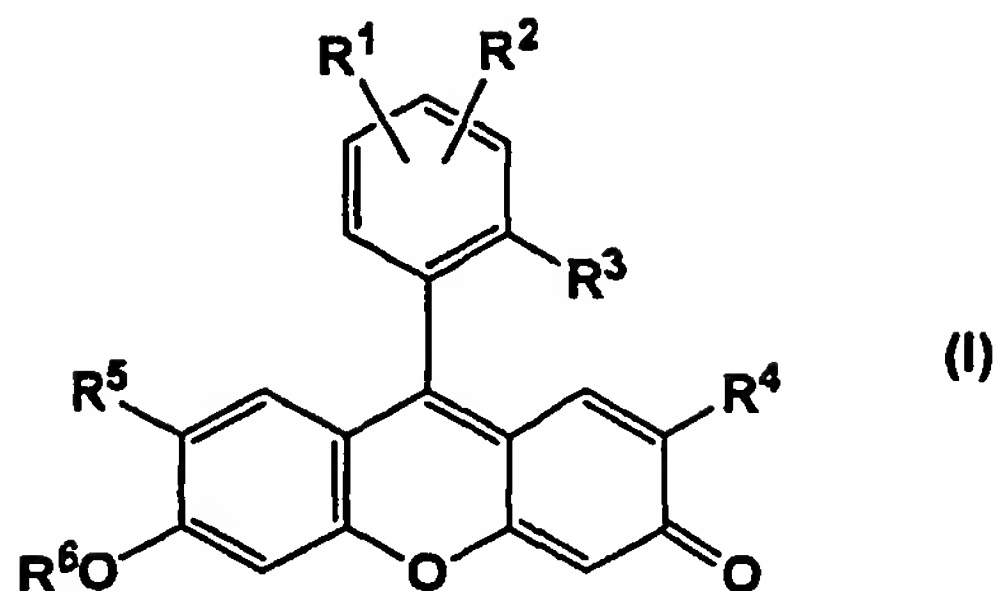
the trapping and derived from the compound represented by the formula (I) be substantially highly fluorescent. The fluorescent probe has excellent fluorescent properties.

[続葉有]



(57) 要約:

下記の式 (I) :



(R¹及びR²は水素原子を示すか、又はプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を示などを示し；R³は一価の置換基を示し；R⁴及びR⁵は水素原子又はハロゲン原子を示し；R⁶は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、ただし、R¹、R²、及びR³の組み合わせは(1)プロトン等の捕捉前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与えるものであり、かつ(2)プロトン等の捕捉後には、式 (I) で表される化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させるものである) で表される蛍光プローブ。蛍光特性に優れた蛍光プローブが提供される。

明 細 書

蛍光プローブ

技術分野

本発明は蛍光プローブに関する。より具体的には、プロトン、金属イオン、又は活性酸素種を捕捉して蛍光を発する蛍光プローブに関するものである。

背景技術

フルオレセインは 19 世紀から知られる蛍光物質で、水溶液中で 500 nm 付近で励起可能であり、量子収率も高いことから蛍光プローブの母核として汎用されている。例えば、一酸化窒素の蛍光プローブ（特開平 10-226688 号公報）、亜鉛の蛍光プローブ（国際公開 WO 01/62755）などの母核に利用されている。

フルオレセインのカルボキシル基を水素原子に置き換えた 6-ヒドロキシ-9-フェニルフルオロンは蛍光量子収率が低くなるため、このカルボキシル基はフルオレセインの蛍光団としての特性に役割を持つと考えられてきた（Lindqvist, L., et al., J. Chem. Phys., 44, 1711-12, 1966）。このような理由から、従来提案されているフルオレセイン誘導体ではフルオレセインの蛍光特性を損なわないようにこのカルボキシル基が保存されており、カルボキシル基を他の官能基に変換した化合物はほとんど知られていない。

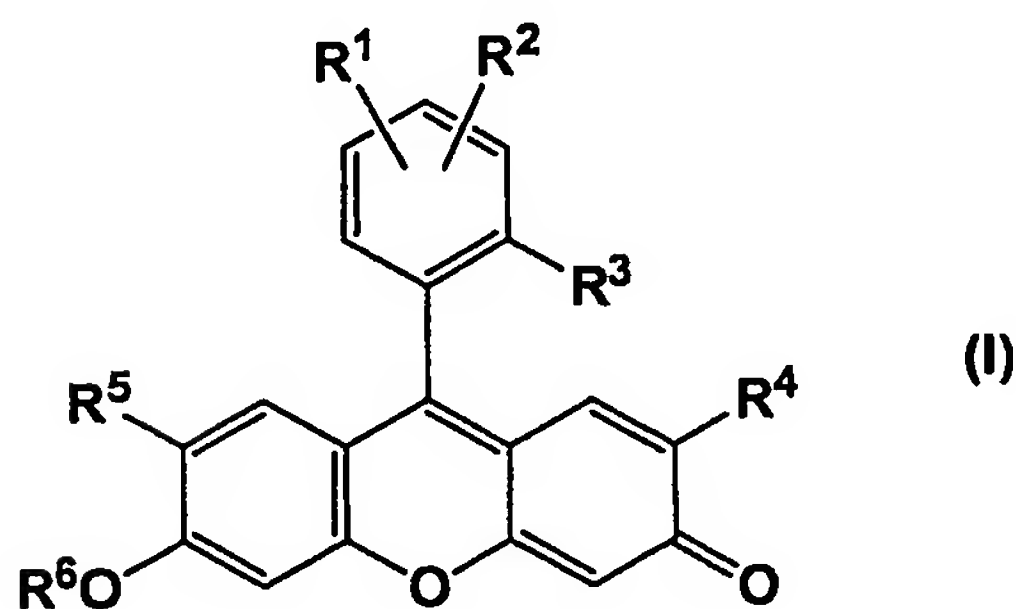
発明の開示

本発明の課題は、蛍光特性に優れた蛍光プローブを提供することにある。本発明者らはフルオレセインの蛍光物質としての性質を種々検討するうち、その蛍光特性はもっぱら三環のキサンテン骨格に基づくものであり、キサンテン環の 9-位に結合する 2-カルボキシフェニル基は蛍光特性に実質的に何の影響も与えていないとの結論に至った。そこで、本発明者らは、2-カルボキシフェニル基の

カルボキシ基を水素原子以外の置換基、例えばメチル基又はメトキシ基などに置換した化合物の蛍光特性を確認したところ、驚くべきことに、これらの化合物がフルオレセインとほぼ同等の強度の蛍光量子収率を有しており、励起波長及び蛍光波長もほぼ同じであることを発見した。

これらの事実、及びカルボキシ基を水素原子に置き換えた6-ヒドロキシ-9-フェニルフルオロンでは蛍光量子収率が低下する事実から、本発明者らはフルオレセインにおけるカルボキシ基の役割がキサンテン環とベンゼン環部の炭素-炭素単結合による自由回転を防ぐことにあり、これによって励起状態の蛍光団が発光過程を経ずに失活する経路を妨げることにありと結論した。さらに、本発明者らは上記の知見を基にして高い蛍光特性を有する蛍光プローブを創出すべく研究を行った結果、キサンテン環の9-位に結合するフェニル基の電子密度が十分に高い化合物では実質的に非蛍光性であり、該フェニル基の電子密度が十分に低い化合物では高い蛍光性を有すること、及びフルオレセインのカルボキシ基を他の官能基に変換して該フェニル基の電子密度を調節することにより、所望の蛍光特性を有する蛍光プローブを合理的に設計できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、蛍光プローブであって、下記の式(I)：



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子を示すか、又はプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を示すが、 R^1 及び R^2 が同時に水素原子であることはなく、あるいは R^1 及び R^2 が互いに結合してプロトン、

金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための環構造を形成し； R^3 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^6 は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、ただし、 R^1 、 R^2 、及び R^3 の組み合わせは

(1)上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与えるものであり、かつ

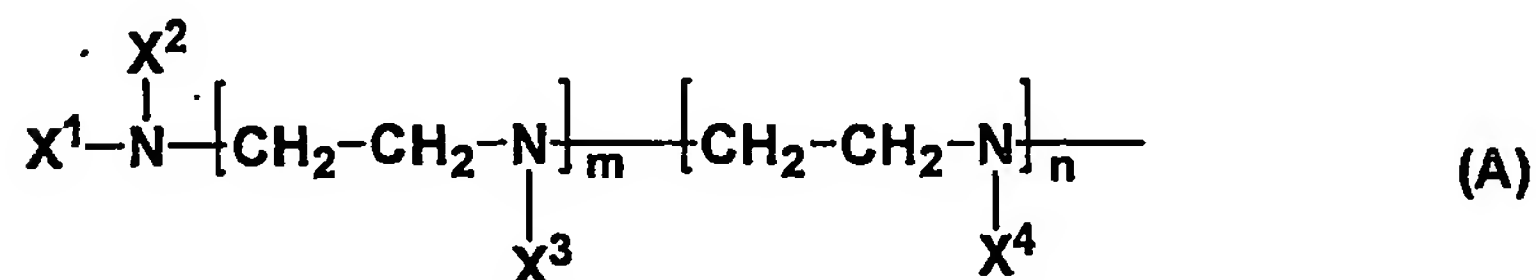
(2)上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後には、式(I)で表される化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させるものである)

で表される蛍光プローブを提供するものである。

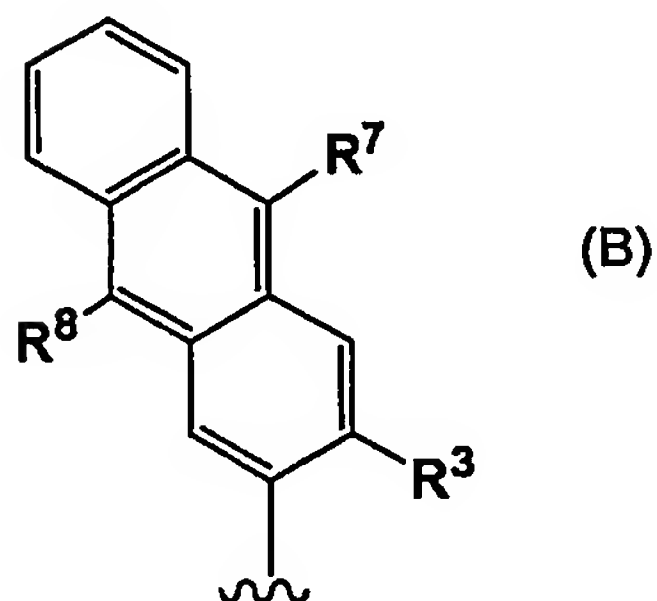
この発明の好ましい態様によれば、 R^6 が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全にアニオンとなるのに十分な塩基性条件下において、上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前の該ベンゼン環の酸化電位が1.40V未満であり、及び上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後の該ベンゼン環の酸化電位が1.40V以上であり、かつ捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20V以上増加する上記の蛍光プローブ； R^6 が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全に非解離状態となるのに十分な酸性条件下において、上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前の該ベンゼン環の酸化電位が1.70V未満であり、及び上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後の該ベンゼン環の酸化電位が1.70V以上であり、かつ捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20V以上増加する上記の蛍光プローブ；及び R^3 が低級アルキル基又は低級アルコキシ基である上記の蛍光プローブ；金属イオンがアルカリ金属イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、又は亜鉛イオンである上記の蛍光プローブ；及び活性酸素種が一酸化窒素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、及びスーパーオキシドからなる群か

ら選ばれる上記の蛍光プローブが提供される。

さらに好ましい態様によれば、亜鉛イオン又は一酸化窒素の測定のための蛍光プローブであって、 R^1 及び R^2 のいずれか又は両方が下記の式 (A)：



(式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、2-ピリジルメチル基、又はアミノ基の保護基を示し、 m 及び n はそれぞれ独立に0又は1を示す) で表される基である上記の蛍光プローブ；一重項酸素測定用のプローブであって、 R^1 及び R^2 が互いに結合して下記の式 (B) で表される環構造：



(式中、 R^7 及び R^8 はそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又はアリール基を示す) を示す上記の蛍光プローブが提供される。

さらに別の観点からは、上記の一般式 (I) (式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子を示すか、又はプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を示すが、 R^1 及び R^2 が同時に水素原子であることはなく、あるいは R^1 及び R^2 が互いに結合してプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための環構造を形成し； R^3 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子又は

ハロゲン原子を示し； R^6 は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示す）で表される蛍光プローブの設計方法であって、 R^1 、 R^2 、及び R^3 の組み合わせとして、

(1) 上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与え、かつ

(2) 上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後には、式(I)で表される化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させる

組み合わせを選択する工程を含む方法が本発明により提供される。さらに、上記の設計方法により得られた蛍光プローブも本発明により提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、フルオレセインのカルボキシル基をアルキル基又はアルコキシ基に変換した誘導体（化合物1～8）について、各化合物の蛍光量子収率とPETドナー部分であるベンゼン環部の酸化電位との関係を示した図である。

第2図は、フルオレセインのカルボキシル基をアルキル基又はアルコキシ基に変換した誘導体（化合物1～8）について、各化合物の蛍光量子収率とPETドナー部分であるベンゼン環部のHOMOエネルギーレベルとの関係を示した図である。

第3図は、PETの概念図及びフルオレセインについてPETドナー部と蛍光団の2つの部位を示した図である。

第4図は、例5で得られた化合物のNaCl又は $CaCl_2$ の濃度依存的な蛍光スペクトルの変化を示した図である。

第5図は、例5（左）、及び例7（右）で得られた化合物の各種カチオン添加による蛍光変化を示した図である。

第6図は、pH変化に対する、例7で得られた化合物とSodium Green,

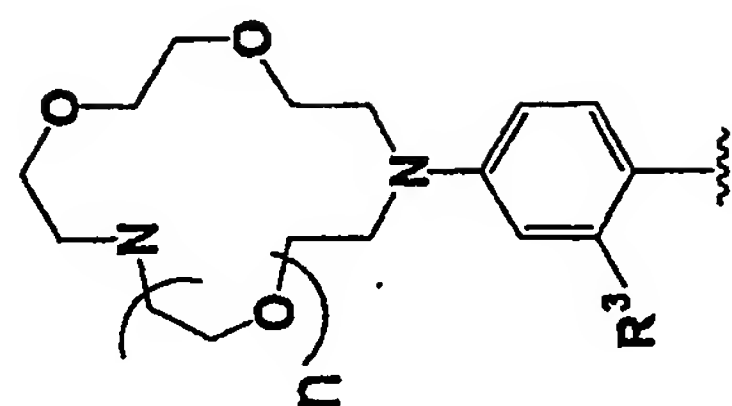
tetra(tetramethylammonium) salt の蛍光強度の変化を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

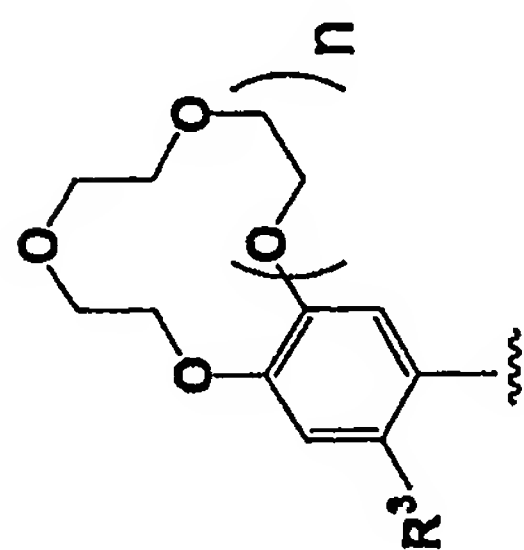
本発明により提供される式 (I) で表される蛍光プローブは、プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の測定用の蛍光プローブとして用いられる (本明細書においてこれらを「測定対象物」と呼ぶ場合がある)。金属イオンとしては、ナトリウムイオンやリチウムイオンなどのアルカリ金属イオン、カルシウムイオンなどのアルカリ土類金属イオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンなどを挙げる事ができる。活性酸素種としては、一酸化窒素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、及びスーパーオキシドなどを挙げる事ができる。もっとも、測定対象物はこれらに限定されることはない。

本発明の蛍光プローブは、従来、フルオレセインを母核として種々提案されている各種測定対象物の測定のための蛍光プローブにおいて、キサントレン環の9位に結合する2-カルボキシフェニル基のカルボキシル基を水素原子、スルホン酸基以外の一価の置換基に変換したことを特徴としている (式 (I) においてこの置換基は R^3 で表される)。また、キサントレン環の9位に結合するベンゼン環上には、いずれか一方又は両者の組み合わせが測定対象物の捕捉に関与する2つの置換基が存在している (式 (I) において R^1 及び R^2 で表されるが、うち1つは水素原子を示す場合もある)。

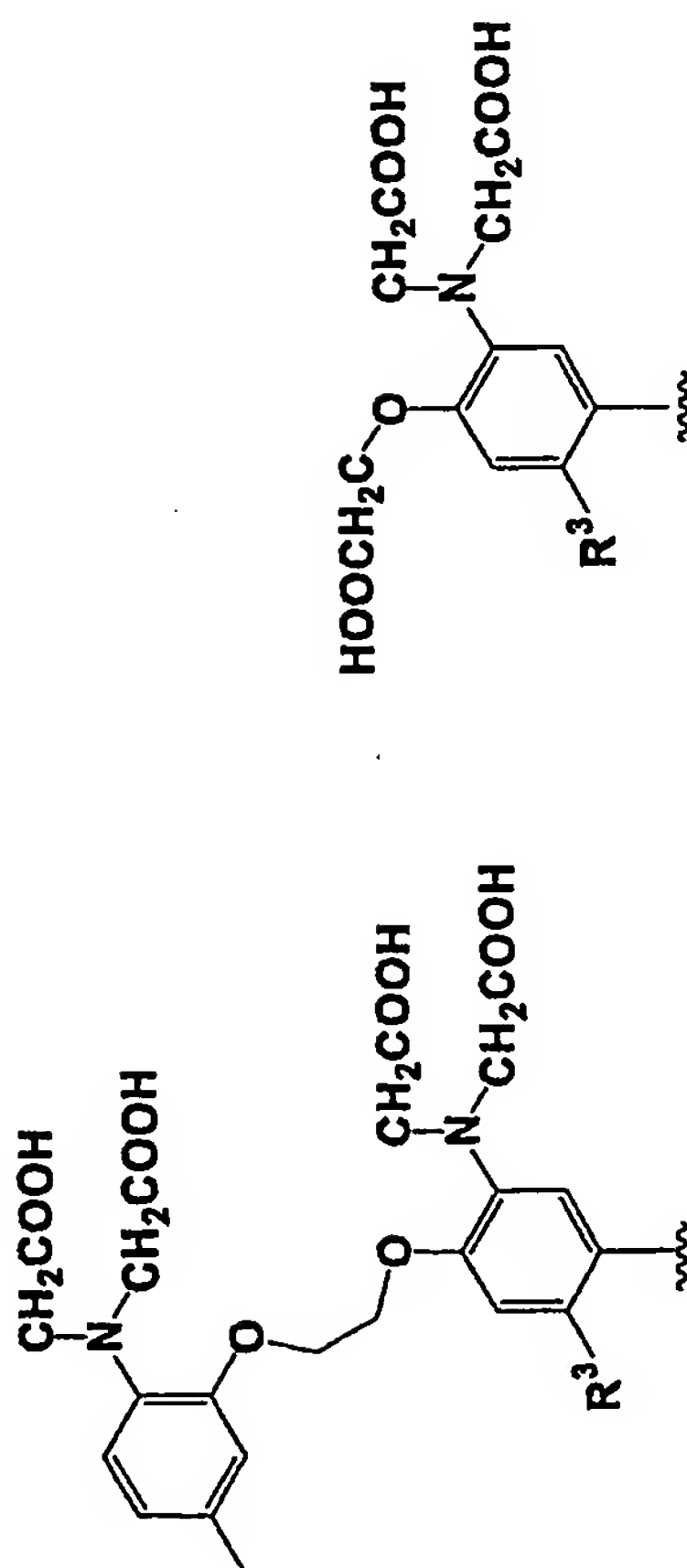
式 (I) で表される化合物において、 R^1 及び R^2 としては従来からプロトン、金属イオン、又は活性酸素種の測定用の蛍光プローブにおいて用いられている測定対象物捕捉用の置換基を用いることができる。ベンゼン環上の R^1 及び R^2 が互いに結合して環構造を形成してプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を形成してもよい。例えば、ベンゼン環上の R^1 及び R^2 の組み合わせとしては、以下に示す基を用いることができるが、これらに限定されることはない (キサントレン環の9位に結合する2-置換フェニル基又はそれに縮合した環を示す)。



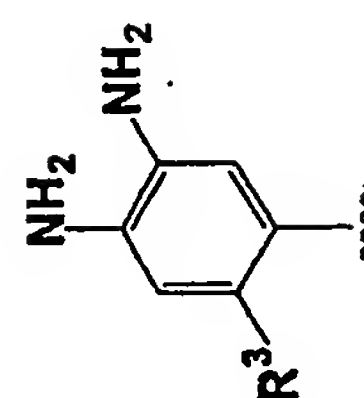
Na⁺ probe (n=1)
K⁺ probe (n=2)



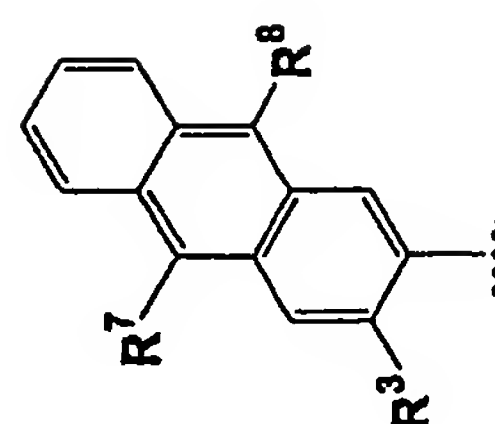
Li⁺ probe (n=1)
Na⁺ probe (n=2)
K⁺ probe (n=3)



Mg²⁺ probe



NO probe

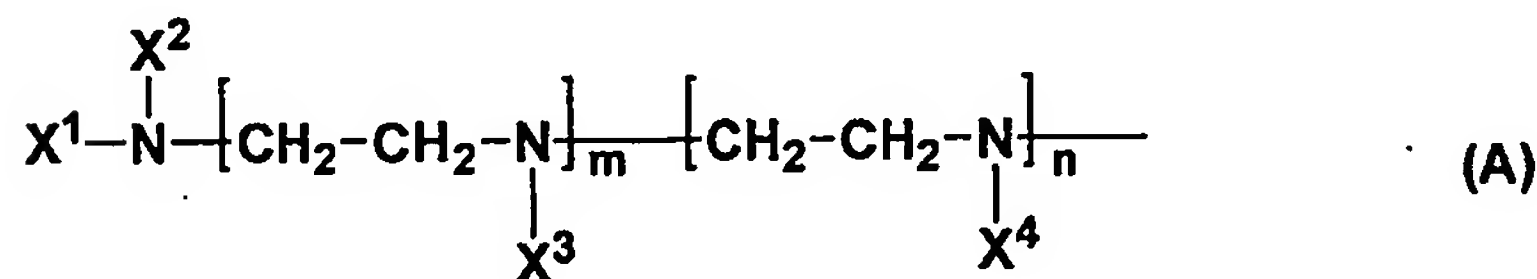


¹O₂ probe

ベンゼン環上における R^1 及び R^2 の置換位置は特に限定されない。また、 R^1 、 R^2 、及び R^3 が結合するベンゼン環上には、これらの置換基以外に任意の置換基が存在していてもよい。測定対象物の捕捉のための置換基は種々提案されており、測定対象物の種類に応じて当業者は適宜選択可能である。例えば、特開平10-226688号公報、国際公開WO 99/51586、特開2000-239272号公報、国際公開WO 01/62755などを参照することができる。また、モレキュラープローブス社のカタログ (Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Sixth edition) の第22章 (カルシウムイオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオン、及び他の金属イオン)、第23章 (pHインディケーター)、及び第24章 (ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオン、及び他の無機イオン) に記載された測定対象物の捕捉のための置換基を用いることもできる。もっとも、測定対象物の捕捉のための置換基は上記刊行物に記載されたものに限定されることはない。

本明細書において「捕捉」という用語は、 R^1 及び／又は R^2 が実質的に化学変化を起こさずに金属イオンをキレート化などにより捕捉する場合のほか、測定対象物との化学反応により R^1 及び／又は R^2 の化学構造が変化する場合を含めて、最も広義に解釈しなければならない、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

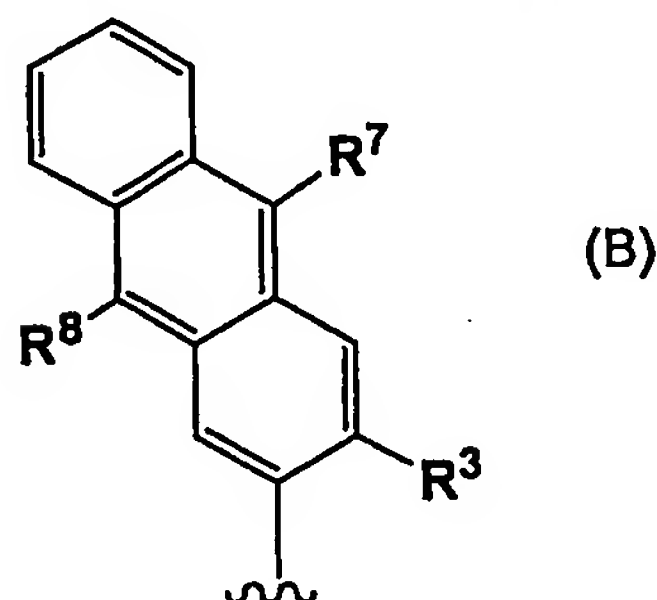
例えば、亜鉛イオン又は一酸化窒素の測定のための蛍光プローブでは、 R^1 及び R^2 のいずれか又は両方が下記の式 (A) :



(式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、2-ピリジルメチル基、又はアミノ基の保護基を示し、 m 及び n はそれぞれ独立に0又は1を示す) で表される基であることが好ましい。

一酸化窒素測定用の蛍光プローブでは R^1 及び R^2 の両方が独立に上記式(A)で表される基を示し、 m 及び n が0であり、 R^1 及び R^2 はベンゼン環上で隣接した位置に置換する。亜鉛イオン測定用の蛍光プローブでは R^1 及び R^2 のいずれか一方が上記式(A)で表される基であり、他方が水素原子であることが好ましい。この場合、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 が2-ピリジルメチル基であることが好ましく、 X^1 及び X^2 が2-ピリジルメチル基であることがより好ましい。また、 m が0であり、 n が1であり、かつ X^4 が水素原子であることが好ましく、この場合に X^1 及 X^2 がともに2-ピリジルメチル基であることが好ましい。

また、一重項酸素測定用のプローブでは、 R^1 及び R^2 が互いに結合して下記の式(B)で表される環構造：



(式中、 R^7 及び R^8 はそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又はアリール基を示す)を示すことが好ましい。 R^7 及び R^8 がそれぞれ独立に置換基を有することもあるフェニル基であることが好ましく、ともにフェニル基であることがさらに好ましい。なお、上記の式(B)はキサントレン環の9-位に結合する基を示しており、環上の置換可能な位置には1又は2以上の他の置換基が存在していてもよい。

本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基(例えばアルキルカルボニル基又はアルキルカルボニルオキシメチル基など)のアルキル部分は、例えば、炭素数1～12個、好ましくは炭素数1～6個、好ましくは炭素数1～4個の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として低級アルキル基(炭素数1～6個のアルキル基)が好ましい。低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、 n -ブチル基、

s e c-ブチル基、イソブチル基、t e r t-ブチル基、シクロプロピルメチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを挙げることができる。本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、塩素原子、又は臭素原子である。

R^3 としては低級アルキル基又は低級アルコキシ基が好ましい。特に好ましいのはメチル基又はメトキシ基である。 R^4 及び R^5 が示すハロゲン原子としては塩素原子又はフッ素原子が好ましい。 R^4 及び R^5 がそれぞれ独立に水素原子、塩素原子、又はフッ素原子であることが好ましい。 R^6 が示すアルキルカルボニル基としては例えばアセチル基などを用いることができ、 R^6 が示すアルキルカルボニルオキシメチル基としてはアセトキシメチル基などを用いることができる。 R^6 が水素原子、アセチル基、又はアセトキシメチル基であることが好ましい。式

(A) で示される基において、アミノ基の保護基の種類は特に限定されないが、例えば、p-ニトロベンゼンスルホン酸基、トリフルオロアセチル基、トリアルキルシリル基などを適宜利用できる。アミノ基の保護基については、例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis)、グリーン (T. W. Greene) 著、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ・インコーポレイテッド (John Wiley & Sons, Inc.) (1981年) などを参照することができる。

本発明の蛍光プローブにおいて、 R^1 、 R^2 、及び R^3 の組み合わせは、測定対象物の捕捉前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与え、かつ(2)測定対象物の捕捉後には、式(I)で表される化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させる組み合わせとして選択される。

R^1 、 R^2 、及び R^3 が結合するベンゼン環の電子密度の情報は、例えば該ベンゼン環の酸化電位を量子化学的手法に従って計算することにより容易に入手する

ことができる。該ベンゼン環の酸化電位が低くなることは該ベンゼン環の電子密度が上昇することを意味しており、これはHOMO軌道エネルギーが高くなることに対応している。例えば、該ベンゼン環部位のHOMOエネルギーを密度汎関数法 (B3LYP/6-31G(d)) により求めることができる。R¹及びR²としては、測定対象物の捕捉後に酸化電位が変化するものを選択する必要がある。なお、本明細書中に記載された酸化電位はすべてAg / Ag⁺を参照電極とした場合の値で示してある。

本明細書の実施例に具体的に示されているように、pH 13のアルカリ水溶液中では、キサンテン環のヒドロキシ基のプロトンは脱離してアニオンになっているが、例えば、この条件下において該ベンゼン環の酸化電位が1.00 V以下の化合物は実質的に無蛍光性であり、該ベンゼン環の酸化電位が1.40 V以上では実質的に強い蛍光性の化合物となる場合がある。また、pH 3.4の酸性条件下では、例えば、該ベンゼン環の酸化電位が1.40 V以下の化合物は実質的に無蛍光性であり、該ベンゼン環の酸化電位が1.70 Vよりも大きい場合は実質的に強い蛍光性の化合物となる場合がある。該ベンゼン環の酸化電位を指標としてR¹、R²、及びR³の組み合わせを選択する際には、(1)測定対象物の捕捉前の化合物において該ベンゼン環に実質的に高い電子密度を与え、かつ(2)測定対象物の捕捉後には該ベンゼン環の電子密度を実質的に低下させる組み合わせを選択することにより、優れた蛍光特性を有する蛍光プローブを得ることができる。

R¹、R²、及びR³の組み合わせとしては、例えば、R⁶が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全にアニオンとなるのに十分な塩基性条件下において、測定対象物の捕捉前の該ベンゼン環の酸化電位が1.40未満であり、及び測定対象物の捕捉後の該ベンゼン環の酸化電位が1.40以上であって、測定対象物の捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20 V以上、好ましくは0.30 V以上、より好ましくは0.35 V以上、特に好ましくは0.40 V以上増加する組み合わせが好ましい。このような塩基性条件としては、pH 12以上、好ましくはpH 13の条件を適用できる。

また、同様に R^6 が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全に非解離状態となるのに十分な酸性条件下において、測定対象物の捕捉前に該ベンゼン環の酸化電位が1.70未満であり、及び測定対象物の捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が1.70以上であって、測定対象物の捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20V以上、好ましくは0.25V以上、特に好ましくは0.30V以上増加する組み合わせが好ましい。このような酸性条件としては、pH4.0以下、好ましくはpH3.4の条件を適用できる。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明者らが見出した上記の知見はPET (Photoinduced Electron Transfer: 光誘起電子移動) により説明できる。PETとは蛍光消光の1つの方法であり、励起光照射により生成する1重項励起蛍光団が蛍光を発して基底状態に戻る速度よりも速く、近隣の電子供与部位(PETドナー)から電子移動が起き、蛍光消光が起こるというものである。式(I)で表される化合物を蛍光団として作用するキサンテン環部位と、蛍光を消光する部位であるベンゼン環部位(PETドナー)に分割して考えると、ベンゼン環の酸化電位が低い(すなわち電子密度が高く、HOMOエネルギーが高い)とPETによりキサンテン環由来の蛍光が消光する。

蛍光プローブとしては、測定対象物の捕捉前には実質的に蛍光がなく、測定対象物の捕捉後には実質的に強い蛍光性物質に変化する性質を有することが求められるので、蛍光強度の変化が大きいものを好適なプローブとして選択することができる。例えば、測定対象物の捕捉前にはPETにより蛍光が消失しており、測定対象物の捕捉後には実質的にPETが生じないようにプローブを設計することも可能である。該ベンゼン環部位の酸化電位を指標にして R^1 、 R^2 、及び/又は R^3 として新規な置換基を導入した蛍光プローブを設計する場合には、官能基を導入後の化合物のベンゼン環の酸化電位と蛍光の減弱との相関を従来の知見から予測できる場合もあるが、酸化電位と蛍光強度との関係について本明細書の実施例に具体的に示された方法により確認することが望ましい。

また、例えば一酸化窒素測定用の蛍光プローブを設計する場合には、 R^1 及び

R^2 が示す隣接したアミノ基（該アミノ基のうち的一方は例えばアルキル基で置換されていてもよい）の電子密度を高めることにより、一酸化窒素と該アミノ基との反応性が高まり、蛍光プローブの感度を高めることができる。従来のフルオレセインを基本骨格とする蛍光プローブでは、ベンゼン環上に存在するカルボキシル基が電気陰性基であることから、該アミノ基の電子密度を低下させ、この結果、反応性を低下させていることが今回判明した。従って、本発明の蛍光プローブにおいて R^3 として例えばアルキル基やアルコキシ基などの電子供与性基を用いると、ベンゼン環の電子密度が高まる結果、一酸化窒素の捕捉前における実質的な無蛍光性が維持されるとともに、該アミノ基の電子密度も高められて一酸化窒素との反応性が改善される。同様に一重項酸素測定用の蛍光プローブにおいても、上記の式（B）で表される反応性基の電子密度を高めることによって、一重項酸素との反応性を高めることができ、かつ一重項酸素の捕捉前における蛍光プローブの実質的な非蛍光性を維持することが可能になる。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明の蛍光プローブを用いた測定対象物の測定方法は、一般的には、

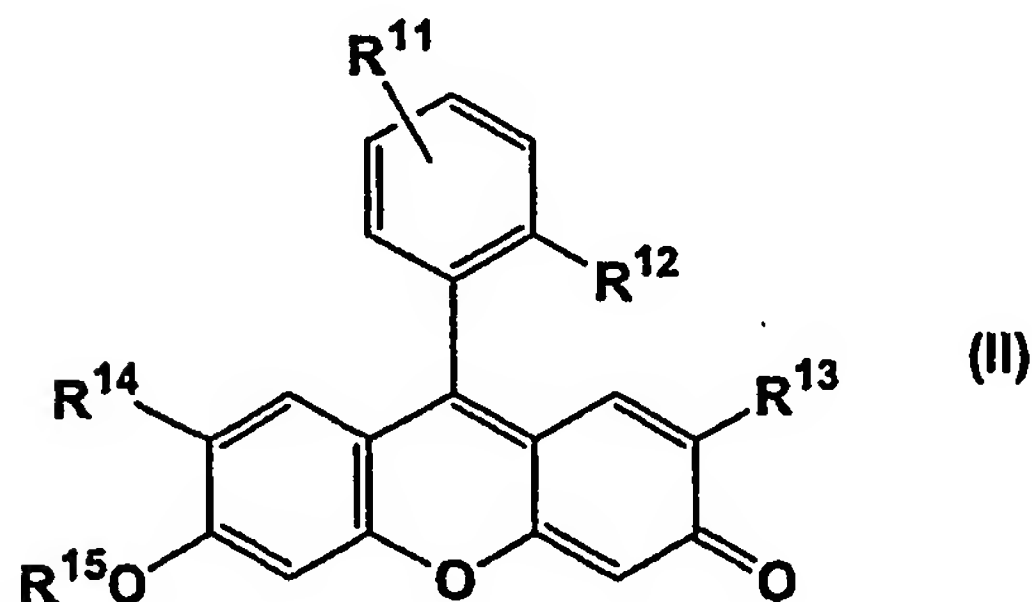
（a）上記式（I）で表される化合物と測定対象物と反応させる工程、及び（b）上記工程（a）で生成した化合物の蛍光を測定する工程を含んでいる。例えば、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体との混合物などに本発明の蛍光プローブ又はその塩を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。

測定対象物を捕捉した後の化合物の蛍光の測定は通常の方法で行うことができ、インビトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメージングの手法を用いてインビボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ま

しい。また、式（I）において R^6 が C_{1-12} アルキルカルボニル基又はアセトキシメチル基の化合物などを用いると、この化合物が細胞膜を通過して細胞内部に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼなどの酵素によりアルキルカルボニル基又はアセトキシメチル基が加水分解された産物を与えるが、この加水分解物は容易に細胞外に排出されずに細胞内の測定対象物と反応して蛍光性の化合物を与える。従って、これらの化合物を測定試薬として用いると、個々の細胞内に局在する測定対象物をバイオイメージング手法により高感度に測定できる。

本発明の蛍光プローブとしては、上記式（I）で表される化合物のほか、その塩を用いてもよい。塩の種類は特に限定されないが、例えば、酸付加塩としては塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、pH調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供される。

別の観点から本発明により提供される化合物は下記の一般式（II）：



(式中、 R^{11} は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示し； R^{12} はアルキル基又はアルコキシ基を示し； R^{13} 及び R^{14} はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^{15} は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示す)で表される。 R^{11} としては水素原子、 C_{1-4} アルキル基、又は C_{1-4} アルコキシ基が好ましく、水素原子、メチル基、又はメトキシ基が好ましい。 R^{12} としては C_{1-4} アルキル基又は C_{1-4} アルコキシ基が好ましく、メチル基又はメトキシ基がより好ましい。 R^{13} 、 R^{14} 、及び R^{15} は水素原子であることが好ましい。この化合物はpHセンサーとして用いることができる。

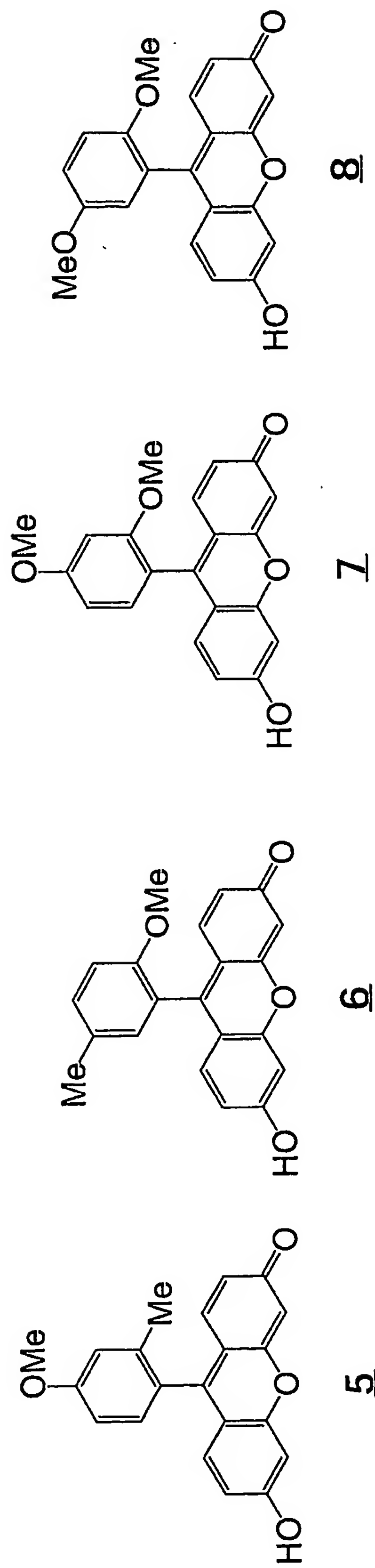
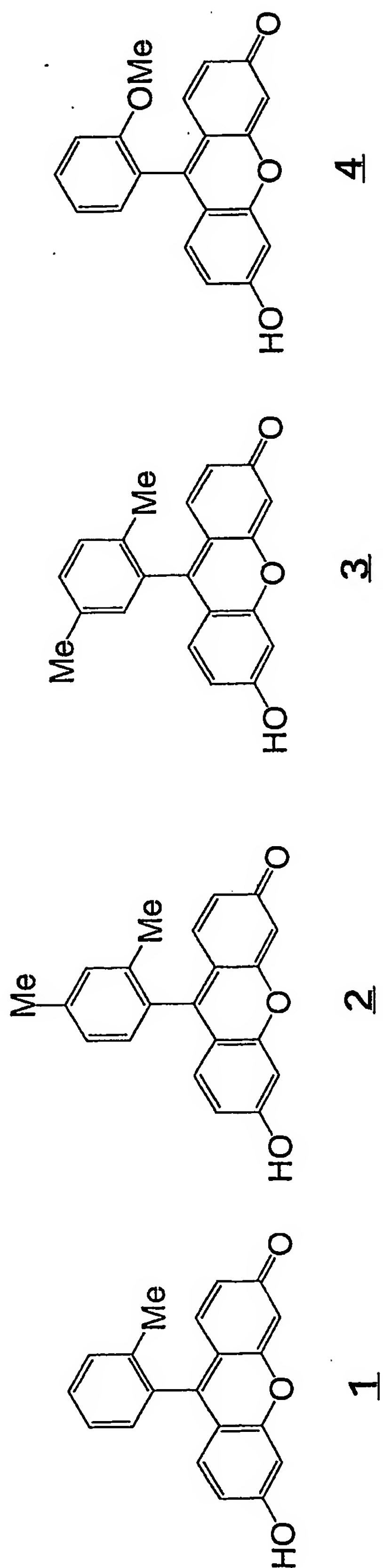
pHセンサーとして好適な置換基の組み合わせは特に限定されないが、例えば、 R^{11} と R^{12} の一方がメチル基、他方がメトキシ基であり、 R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} がともに水素原子である化合物は、酸性域で無蛍光であるためpHの変化を明瞭に測定することができる。また、 R^{11} が水素原子、 R^{12} がメチル基又はメトキシ基である化合物、あるいは R^{11} 及び R^{12} がともにメチル基である化合物において、 R^{13} 及び／又は R^{14} がフッ素原子又は塩素原子である化合物は、レシオ法によるpH変化の測定に好適である。さらに R^{15} がアセチル基又はアセトキシメチル基である化合物は、細胞内のpH変化を測定するpHセンサーとして好適である。

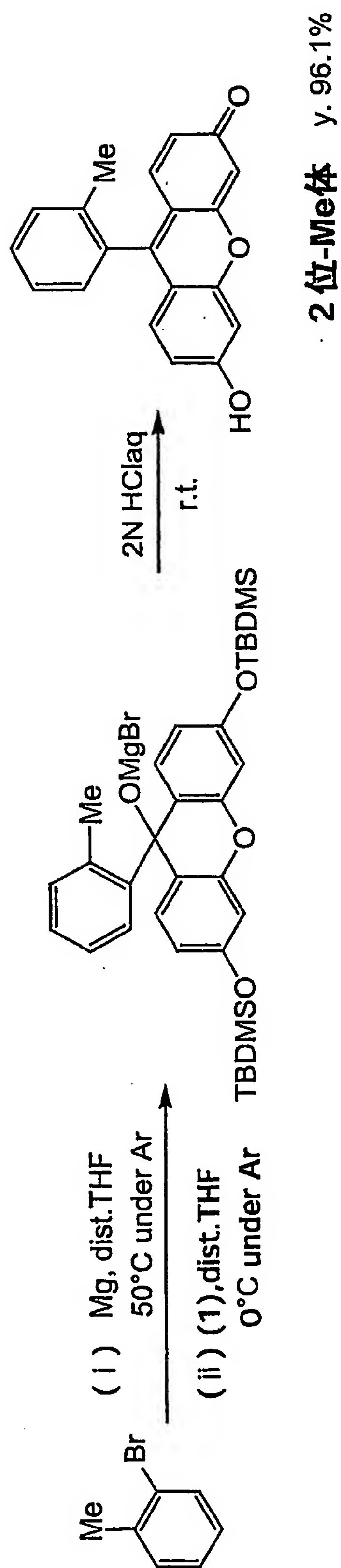
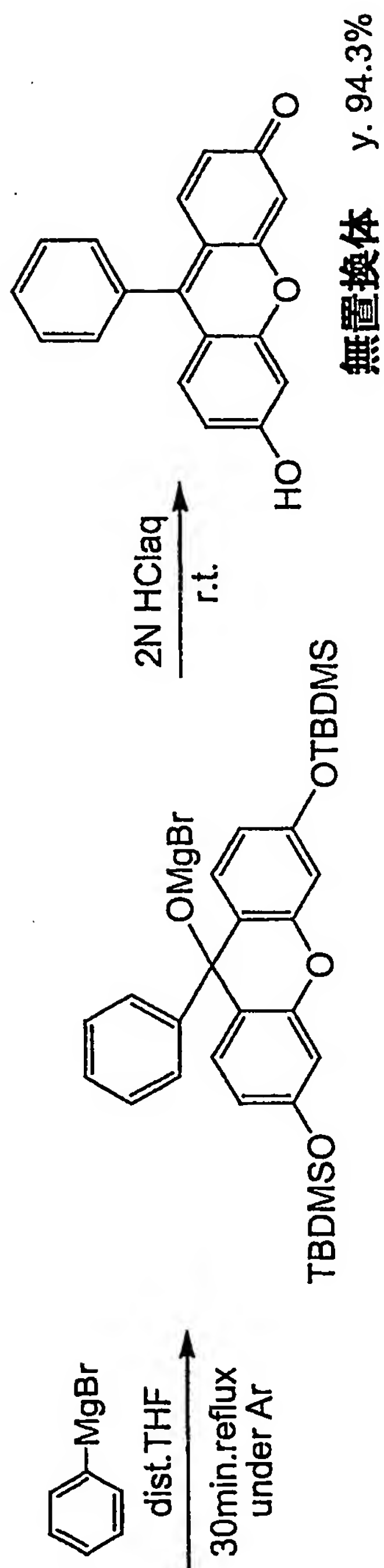
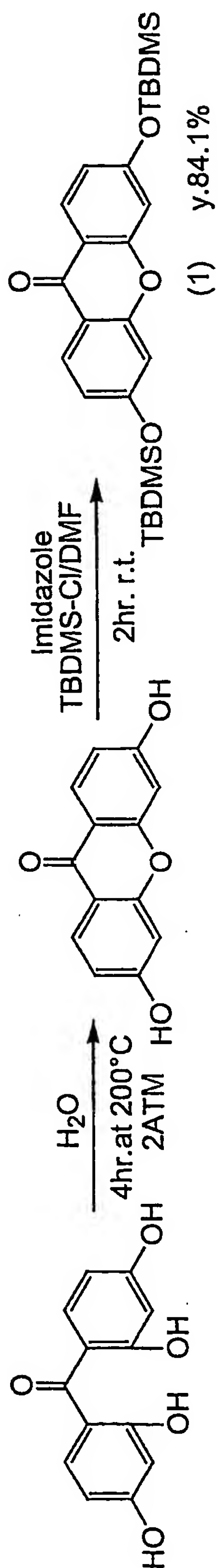
実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：化合物の合成

下記の化合物を合成した。これらの化合物は化合物No. が大きくなるほどキサテン環の9一位に結合するベンゼン環の酸化電位が低くなる（すなわち電子密度が高くなる、換言すればHOMO起動エネルギーが高くなる）ように設計した。また、無置換ベンゼン体及び化合物1の合成スキームを以下に示した。





キサントンを *Proc. Indian. Acad. Sci. Sect. A.*, 57, 280 (1963) に記載された方法で合成し、得られたキサントンをジ(*tert*-ブチルジメチルシリル) 保護体 (キサントン-TBDMS) とした (*J. Biol. Chem.*, 264, 14, 8171 (1989)). よく乾燥させた容器に Mg 109 mg (4.50 mmol) を入れ、真空ポンプで減圧にしながら 250℃ で 180 分間加熱攪拌した。放冷後、アルゴン置換にかえ、2-プロモトルエン 77 mg (0.45 mmol) を蒸留した THF 2 ml に溶解して加え、60℃ まで徐々に加熱した。反応液が暗緑色に変化したのを確認して氷冷した。キサントン-TBDMS 137 mg (0.300 mmol) を蒸留した THF 2 ml に溶解して加え、10 分間攪拌した。反応液に 2N HCl 水溶液 10 ml を加えて攪拌すると黄色固体が析出した。この固体を濾取した後、少量の THF で洗浄して乾燥し黄色固体を得た (87 mg, 収率 96%)。

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 2.00 (3H, s), 7.01 (2H, d, J=9.15Hz), 7.10 (2H, s), 7.21 (2H, d, J=9.15Hz), 7.31 (1H, d, J=7.14Hz), 7.52 (3H, m)

MS(EI) 302 (M⁺)

同様にして化合物 2 ~ 化合物 8 を得た。

化合物 2

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 1.97 (3H, s), 2.42 (3H, s), 7.01 (2H, d, J=9.15Hz), 7.10 (2H, s), 7.21 (4H, m), 7.34 (1H, s)

MS(EI) 316 (M⁺)

化合物 3

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 1.95 (3H, s), 2.35 (3H, s), 6.99 (2H, d, J=9.15Hz), 7.05 (2H, s), 7.12 (1H, s), 7.21 (2H, d, J=9.15Hz), 7.39 (2H, m)

MS(EI) 316 (M⁺)

化合物 4

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 3.70 (3H, s), 7.02 (2H, d, J=9.20Hz), 7.08 (2H,

s), 7.23 (2H, t, J=7.50Hz), 7.34 (4H, m), 7.68 (1H, m)

MS(EI) 318 (M⁺)

化合物 5

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 1.98 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.96 (2H, d, J=9.15Hz), 7.03 (3H, m), 7.10 (1H, s), 7.23 (1H, d, J=8.22Hz), 7.28 (2H, d, J=9.15Hz)

MS(EI) 332 (M⁺)

化合物 6

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 2.33 (3H, s), 3.66 (3H, s), 7.07 (2H, d, J=9.15Hz), 7.14 (3H, m), 7.26 (1H, d, J=8.88Hz), 7.42 (1H, d, J=9.15Hz), 7.48 (1H, d, J=8.88Hz)

MS(EI) 332 (M⁺)

化合物 7

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 3.70 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.83 (1H, d, J=8.43Hz), 6.89 (1H, s), 7.06 (2H, d, J=9.36Hz), 7.12 (2H, s), 7.26 (1H, d, J=8.43Hz), 7.47 (2H, d, J=9.36Hz)

MS(EI) 348 (M⁺)

化合物 8

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 3.64 (3H, s), 3.76 (3H, s), 6.96 (1H, s), 7.04 (2H, d, J=9.15Hz), 7.10 (2H, s), 7.23 (1H, d, J=9.15Hz), 7.30 (1H, d, J=9.15Hz), 7.23 (2H, d, J=9.15Hz)

MS(EI) 348 (M⁺)

例 2

上記で合成した各化合物の蛍光量子収率とベンゼン環部の酸化電位との関係を調べた。結果を第 1 図に示す。図に示した結果から明らかなように、各化合物の蛍光量子収率はベンゼン環部の酸化電位に依存して変化した。pH 13 のアルカリ水溶液中ではキサンテン環の OH 基のプロトンは脱離してアニオンになってお

り、この条件では酸化電位が1.00V以下ではほぼ無蛍光となり、1.40V以上では量子収率がほぼ1に近い蛍光を有していた。その間は酸化電位が低下するに従って量子収率の減少が見られた。pH 3.4の酸性条件下では、塩基性条件下に比べ蛍光の変化するベンゼン環の酸化電位が変化した。すなわち、酸化電位が1.40V以下ではほぼ無蛍光であり、1.70V以上では量子収率がほぼ0.3の蛍光を発した。なお、pH 3.4ではキサンテン環のOH基はプロトネートしており、この条件下でのフルオレセインの量子収率はほぼ0.3位であることが知られている。

例3

一般に化合物の酸化電位は量子化学計算により予測可能である。そこで、上記化合物のベンゼン環部位のHOMOエネルギーを密度汎関数法(B3LYP/6-31G(d))により求め、これと蛍光量子収率との関係をプロットした。その結果、例2で酸化電位を指標として得られた結果とほぼ同様の関係が得られた(第2図)。この結果から、本発明の化合物の蛍光特性は量子化学計算から定量的に予想可能であることが示された。この知見に基づいて、本発明の合理的な蛍光プローブ設計方法を実施することができる。

例4

PET(Photoinduced Electron Transfer: 光誘起電子移動)とは蛍光消光の1つの方法であり、励起光照射により生成する1重項励起蛍光団が蛍光を発して基底状態に戻る速度よりも速く、近隣の電子供与部位(PETドナー)から電子移動が起き、蛍光消光が起こるというものである。本発明の化合物を蛍光団であるキサンテン部位と、蛍光を消光する部位であるベンゼン環部(PETドナー)に分割して考えた場合、ベンゼン環の酸化電位が低い(すなわち電子密度が高い、換言すればHOMOエネルギーが高い)とPETによりキサンテン由来の蛍光が消光する。実際、両部位はフルオレセインのX線

結晶解析からほぼ直交していることが明らかになっており、また化合物 1 ～ 8 では励起・蛍光波長がほぼ同じであることから、本発明の化合物を 2 つの部位に分割して考察する仮説は妥当性が高い。P E T の概念図及びフルオレセインを 2 つの部位に分割した概念図を第 3 図に示した。

蛍光プローブとしては、測定対象物が存在しない場合は蛍光が無く、測定対象物を捕捉して初めて蛍光を発する機能を持つ分子である。すなわち、前者の状態では P E T により蛍光が消光しており、後者の状態では P E T が起こらなくなる蛍光プローブを設計することにより、理想的な蛍光プローブが得られる。どの程度の酸化電位を持てば蛍光が減弱するかは、例えば例 2 に示した実験で容易に明らかにすることが可能であり、また新規の蛍光団に対してもその還元電位を測定することで容易に予想可能である。P E T ドナー部として作用するベンゼン環部位は、測定対象物と特異的に配位結合を形成したり、反応することによりその酸化電位が変化するものを選定すればよい。この際、捕捉前後の P E T ドナー部の酸化電位は量子化学計算から予想可能である。以上のステップにより、目的とする蛍光プローブを一切の合成無しに設計することが可能となる。

例えば、一酸化窒素測定用の蛍光プローブの設計のためには、ベンゼン環上に存在する隣接する 2 つのアミノ基（一方のアミノ基はアルキル基などの置換基を有していてもよい）と一酸化窒素との反応速度は測定感度を直接規定する因子となる。このため高感度化を図るためには、ベンゼン環部の電子密度を高めてアミノ基の電子密度を高めることが望まれる（すなわちベンゼン環部の HOMO エネルギーを上昇させることが望まれる）。従来用いられていたフルオレセインには電子吸引性基であるカルボキシル基が存在していたため、ベンゼン環の電子密度を低下させてしまい、この結果、アミノ基の反応性が低下して測定感度を高められないという問題があった。一方、本発明の化合物では R³ の置換基として電子供与性基を導入することが可能であり、それによりベンゼン環部の電子密度を高めてアミノ基の電子密度を高めることができ、測定感度に優れた蛍光プローブを設計できる。そして、このような蛍光プローブにおいて、測定対象物が存在し

ない場合はPETにより蛍光が消光しており、測定対象物を捕捉した場合にはPETが起こらなくなる蛍光プローブを選択することにより、測定感度に優れ、かつ理想的な蛍光特性を有する蛍光プローブを得ることができる。

例5：クラウンエーテル結合フルオレセイン誘導体の製造

キサントンを Proc. Indian. Acad. Sci. Sect. A., 57, 280 (1963)に記載された方法で合成し、得られたキサントンをジ(t e r t -ブチルジメチルシリル)保護体(キサントン-TBDMS)とした(J. Biol. Chem., 264, 14, 8171(1989))。

4-メチルカテコール 3.5 g (28 mmol)を 100 mL のジクロロメタンに溶解して -10℃～0℃の塩氷浴上にて攪拌し、臭素 5 g (31 mmol)の 20 mL ジクロロメタン溶液をゆっくりと滴下した。白い固体が析出した時点で滴下を終了し、反応液を飽和アスコルビン酸水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液 (各 100 mL) で洗い、溶媒を減圧溜去して白色固体を得た(4.1g、収率 71%)。

ジムロート冷却管を備えたナスコルベンに 4-ブロモ-5-メチルカテコール 1.0 g(4.9 mmol)、テトラエチレングリコール ジ-p-トシレート 2.5 g (5.0 mmol)、フッ化セシウム 5 g (33 mmol)、アセトニトリル 100 mL をいれ、アルゴン雰囲気下で 90℃で 20 時間加熱還流した。反応液を減圧溜去し、十分な量の酢酸エチルに溶かして濾過し、固体を除去した。得られた濾液を減圧溜去して白色固体の 4-ブロモ-5-メチルベンゾ-15-クラウン-5-エーテル 1.9 g を得た。NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/メタノール=20/1(v/v))で精製して白色固体を得た(0.60 g、収率 34%)

アルゴン雰囲気下でよく乾燥した二頸コルベンに 15 mL の 2-メチルテトラヒドロフランに溶解した 4-ブロモ-5-メチルベンゾ-15-クラウン-5-エーテル 150 mg (0.415 mmol)を入れ、液体窒素/イソペンタン浴中で約-150℃にて攪拌した。1.54 M の t-ブチルリチウム/n-ペンタン溶液 1 mL(1.54 mmol)をゆっくりと滴下した。30 分攪拌した後、3 mL の 2-メチルテトラヒドロフランに溶解したキサントン-TBDMS 190 mg (0.416 mmol)をゆっくり滴下した。1 時間攪拌した後、2N 塩

酸水溶液を加え 80℃で 1 時間加熱した。反応液を減圧溜去し、残渣をジクロロメタンに溶解して 2N 塩酸水溶液で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧溜去して赤橙色のオイル状粗成生物を得た。この生成物をアルミナカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:ジクロロメタン/メタノール=15/1(v/v))にて精製して、下記構造の化合物を赤橙色オイル状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$

$\Delta = 1.95\text{ppm}$ (s, 3H, a)

3.8 - 4.2 (m, 16H, b)

6.66 (s, 1H, c)

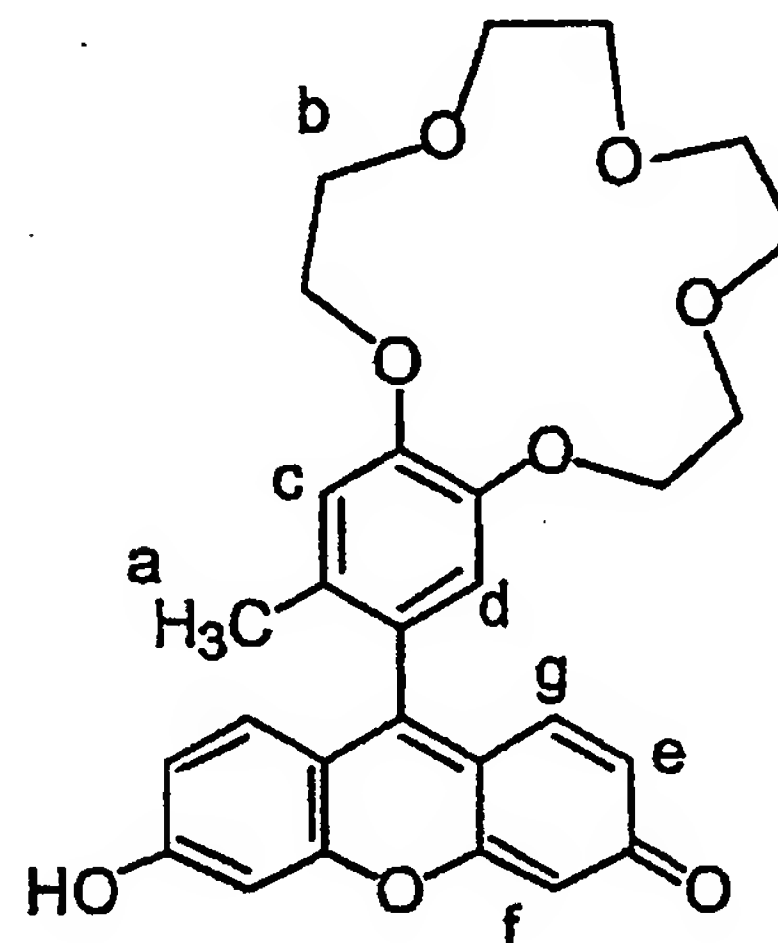
6.86 (s, 1H, d)

6.91 (dd, 2H, e, $J_{ef} = 1.92$)

7.05 (d, 2H, f)

7.31 (d, 2H, g, $J_{eg} = 9.24$)

MS(FAB) 492(MH^+)



例 6

上記の例 5 で得られた化合物の蛍光量子収率を測定した。測定は F-4500 (株式会社日立製作所) で行った。例 5 の化合物の蛍光スペクトルをジメチルホルムアミド (0.03%) を共溶媒として NaCl 又は CaCl_2 を含む pH 9 の水溶液中で測定した。測定溶液の pH は塩酸を加えて調整した。結果を以下の表に示す。

表 1

濃 度	Ca^{2+}	Na^+
3M	0.295	0.043
0.1M	0.02	0.03

例 5 の化合物 (終濃度 $0.5 \mu\text{M}$) のジメチルホルムアミド溶液を NaCl 又は CaCl_2

を含む pH 9 の水溶液で希釈して NaCl 又は CaCl₂ の濃度に依存した蛍光スペクトルの変化を調べた。結果を第 4 図に示す。

例 7 : クラウンエーテル結合ジクロロフルオレセイン誘導体の合成

2,7-ジクロロキサン トンを *J. Chem. Sci. (Lond)*, 3982 (1955) 、
Proc. Indian. Acad. Sci. Sect. A , 57, 280 (1963) 及び *J. Biol. Chem.* , 264, 14, 8171
(1989) に記載された方法で合成し、得られた 2,7-ジクロロキサン トンをジ (tert-
ブチルジメチルシリル) 保護体 (2,7-ジクロロキサン トン-TBDMS) とした。

アルゴン雰囲気下のよく乾燥した二頸コルベンに 15mL の 2-メチルテトラヒド
ロフランに溶解した 4-ブromo-5-メチルベンゾ-15-クラウン-5-エーテル 150 mg
(0.415 mmol) を入れ、液体窒素/イソペンタン浴中で約-150℃にて攪拌した。
1.54M の t-ブチルリチウム/n-ペンタン溶液 1mL (1.54mmol) をゆっくりと滴下し
た。30 分攪拌した後、3mL の 2-メチルテトラヒドロフランに溶かした 2,7-ジクロ
ロキサン トン-TBDMS 190mg (0.416mmol) をゆっくりと滴下した。1 時間攪拌
した後、2N 塩酸水溶液を加え 80℃で 1 時間加熱した。反応液を減圧溜去し、残
渣をジクロロメタンに溶かして 2N 塩酸水溶液で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで
乾燥し、減圧溜去して赤橙色のオイル状組成物を得た。シリカゲルカラムクロ
マトグラフィー (溶出溶媒 : ジクロロメタン/メタノール=7/1(v/v)) にて精製し、
下記構造の化合物を赤橙色のオイル状物質として得た。

¹H-NMR(CDCl₃,300MHz) $\Delta=1.94\text{ppm}$ (s,3H,a)

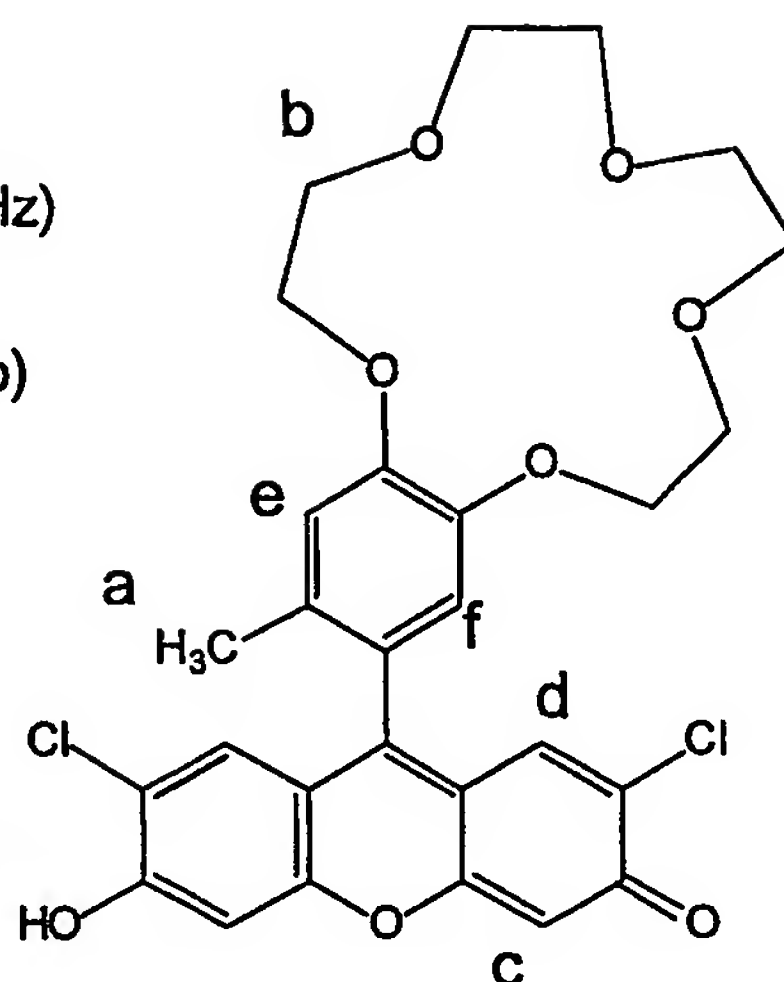
3.6 - 4.2 (m,16H,b)

6.26 (s,2H,c)

6.81 (s,2H,d)

6.84 (s,1H,e)

7.04 (s,1H,f)

MS(FAB) 583 (MNa⁺)585(M+2Na⁺)

例 8

上記の例 5 で得られた化合物及び例 7 で得られた化合物のナトリウム、マグネシウム、カリウム添加による蛍光強度変化を測定した。ナトリウム及びマグネシウム添加時の測定はジメチルホルムアミド (0.1%) を共溶媒として、種々の濃度の過塩素酸ナトリウム、過塩素酸マグネシウムを含む pH7.5 の 0.2M トリスー過塩素酸バッファー中で、カリウム添加時の測定はジメチルホルムアミド (0.1%) を共溶媒として、種々の濃度の塩化カリウムを含む pH7.5 の 0.2M トリスー塩酸バッファー中で測定した。測定溶液中の例 5 で得られた化合物及び例 7 で得られた化合物の最終濃度は 3 μM となるよう調整し、例 5 で得られた化合物については励起波長 492nm、蛍光波長 513 nm、例 7 で得られた化合物については励起波長 504nm、蛍光波長 524nm で測定した。測定結果を第 5 図に示す。この結果より各カチオンの錯体形成定数を算出した結果を以下に示す。

表 2

	錯体形成定数 (mM)		
	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺
例 5 の化合物	0.31	0.25	測定不能
例 7 の化合物	0.32	0.41	測定不能

例 9

pH 変化に対する例 7 で得られた化合物と Sodium Green, tetra(tetramethylammonium)salt (モレキュラープローブ社) の蛍光強度の変化をナトリウム共存下で調べた。測定はジメチルホルムアミド (0.1%) を共溶媒として、500mM の過塩素酸ナトリウムを含む種々の pH の 0.2M トリスーリン酸バッファー中で、例 7 で得られた化合物については励起波長 504nm、蛍光波長 522nm、Sodium Green, tetra(tetramethylammonium)salt については励起波長 508nm、蛍光波長 533nm で行った。測定結果を第 6 図に示す。

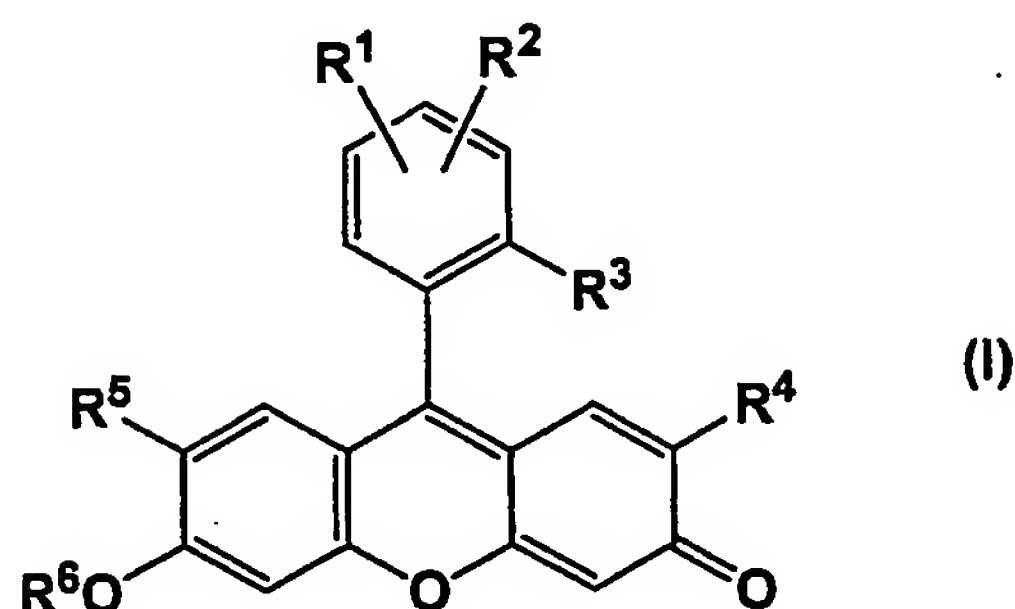
例 7 で得られた化合物は pH5 付近まで蛍光強度が安定であり Sodium Green, tetra(tetramethylammonium)salt と比べて pH 変化の影響を受けにくいプローブであることがわかる。

産業上の利用可能性

本発明により、蛍光特性に優れた蛍光プローブが提供される。また、本発明の設計方法により、蛍光特性に優れた蛍光プローブを合理的に設計できる。

請求の範囲

1. 蛍光プローブであって、下記の式 (I) :



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子を示すか、又はプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を示すが、 R^1 及び R^2 が同時に水素原子であることはなく、あるいは R^1 及び R^2 が互いに結合してプロトン、金属イオン、活性酸素種を捕捉するための環構造を形成してもよく； R^3 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^6 は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示し、ただし、 R^1 、 R^2 、及び R^3 の組み合わせは

(1) 上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与えるものであり、かつ

(2) 上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後には、式 (I) で表される化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させるものである)

で表される蛍光プローブ。

2. R^6 が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全

にアニオンとなるのに十分な塩基性条件下において、上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前の該ベンゼン環の酸化電位が1.40V未満であり、及び上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後の該ベンゼン環の酸化電位が1.40V以上であり、かつ捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20V以上増加する請求項1に記載の蛍光プローブ。

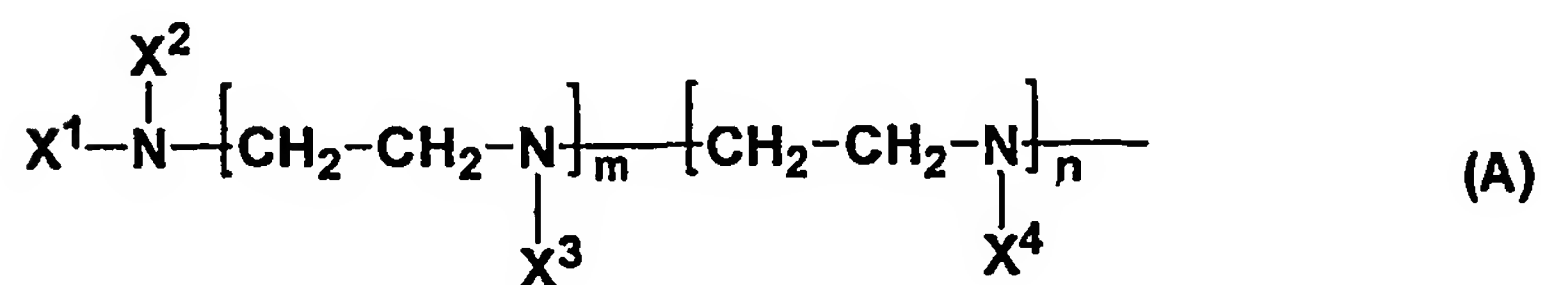
3. R^6 が水素原子の場合に、キサンテン環のヒドロキシル基が実質的に完全に非解離状態となるのに十分な酸性条件下において、上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前の該ベンゼン環の酸化電位が1.70V未満であり、及び上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後の該ベンゼン環の酸化電位が1.70V以上であり、かつ捕捉後に該ベンゼン環の酸化電位が0.20V以上増加する請求項1又は2に記載の蛍光プローブ。

4. R^3 が低級アルキル基又は低級アルコキシ基である請求項1ないし3のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

5. 金属イオンがアルカリ金属イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、又は亜鉛イオンである請求項1ないし4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

6. 活性酸素種が一酸化窒素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、及びスーパーオキシドからなる群から選ばれる請求項1ないし4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

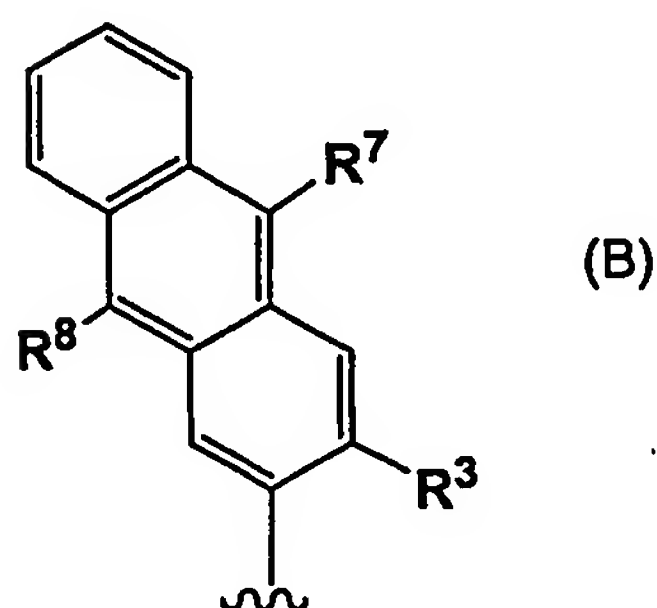
7. 亜鉛イオン又は一酸化窒素の測定のための蛍光プローブであって、 R^1 及び R^2 のいずれか又は両方が下記の式(A)：



(式中、 X^1 、 X^2 、 X^3 、及び X^4 はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、2-

ピリジルメチル基、又はアミノ基の保護基を示し、 m 及び n はそれぞれ独立に0又は1を示す)で表される基である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

8. 一重項酸素測定用のプローブであって、 R^1 及び R^2 が互いに結合して下記の式(B)で表される環構造:



(式中、 R^7 及び R^8 はそれぞれ独立に C_{1-4} アルキル基又はアリール基を示す)を示す請求項1ないし4のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

9. 請求項1に記載の一般式(I)(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子を示すか、又はプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための置換基を示すが、 R^1 及び R^2 が同時に水素原子であることはなく、あるいは R^1 及び R^2 が互いに結合してプロトン、金属イオン、若しくは活性酸素種を捕捉するための環構造を形成し; R^3 は水素原子、カルボキシ基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し; R^4 及び R^5 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し; R^6 は水素原子、アルキルカルボニル基、又はアルキルカルボニルオキシメチル基を示す)で表される蛍光プローブの設計方法であって、 R^1 、 R^2 、及び R^3 の組み合わせとして、

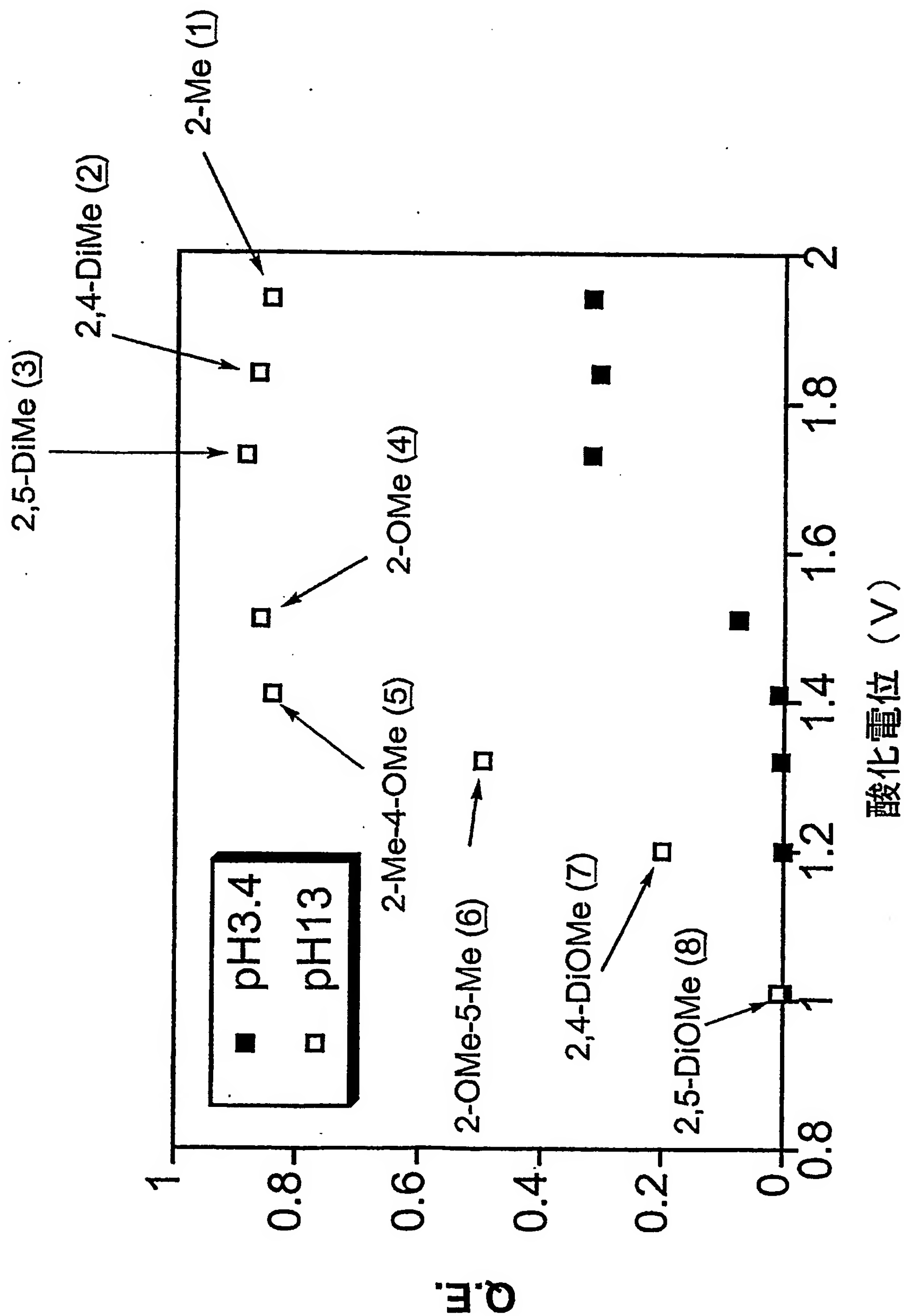
(1)上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環に実質的に高い電子密度を与え、かつ

(2) 上記プロトン、金属イオン、又は活性酸素種の捕捉後には、式(I)で表さ

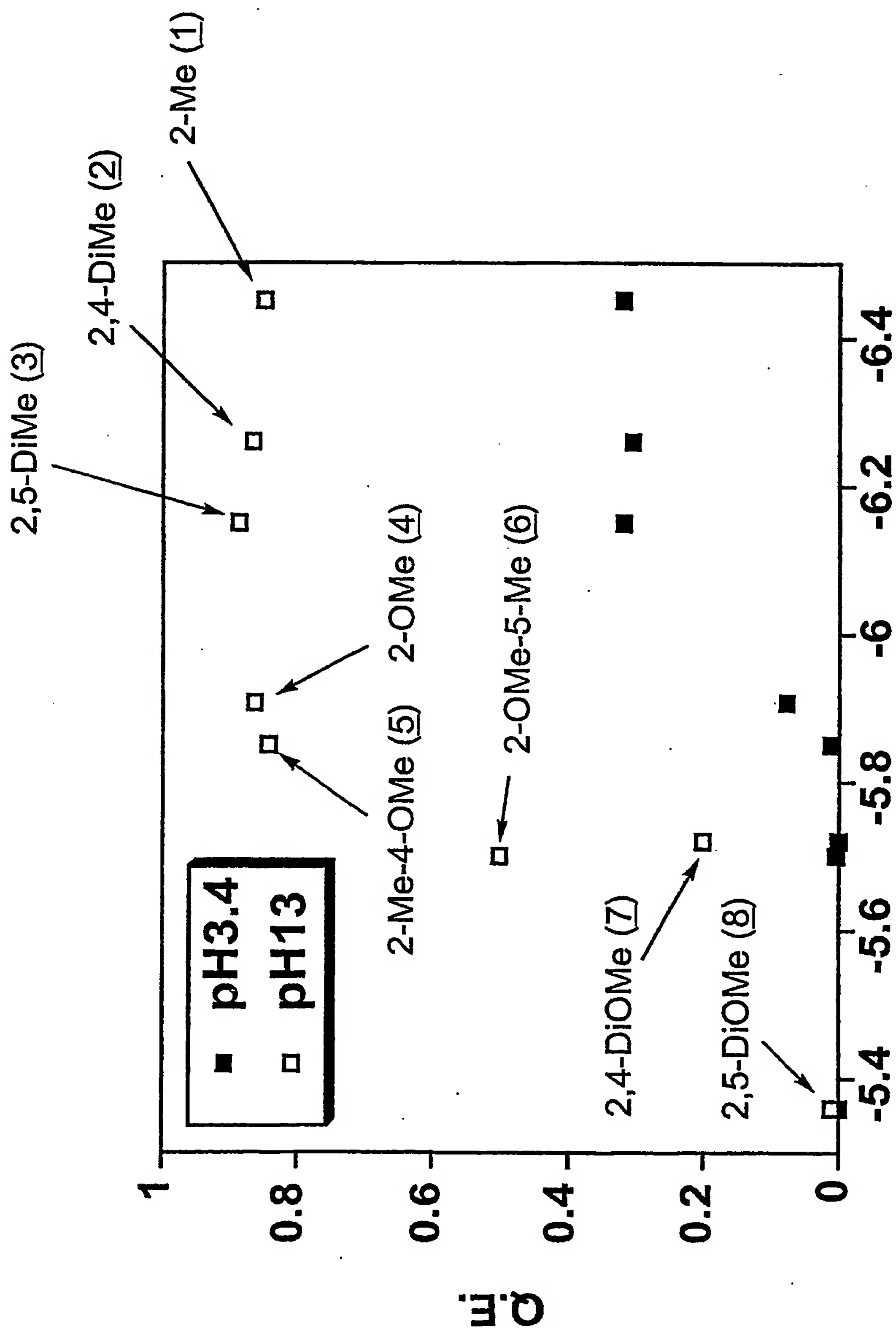
れる化合物に由来する捕捉後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように、それらが結合するベンゼン環の電子密度を実質的に低下させる組み合わせを選択する工程を含む方法。

10. 請求項9に記載の方法により得られた蛍光プローブ。

第1図

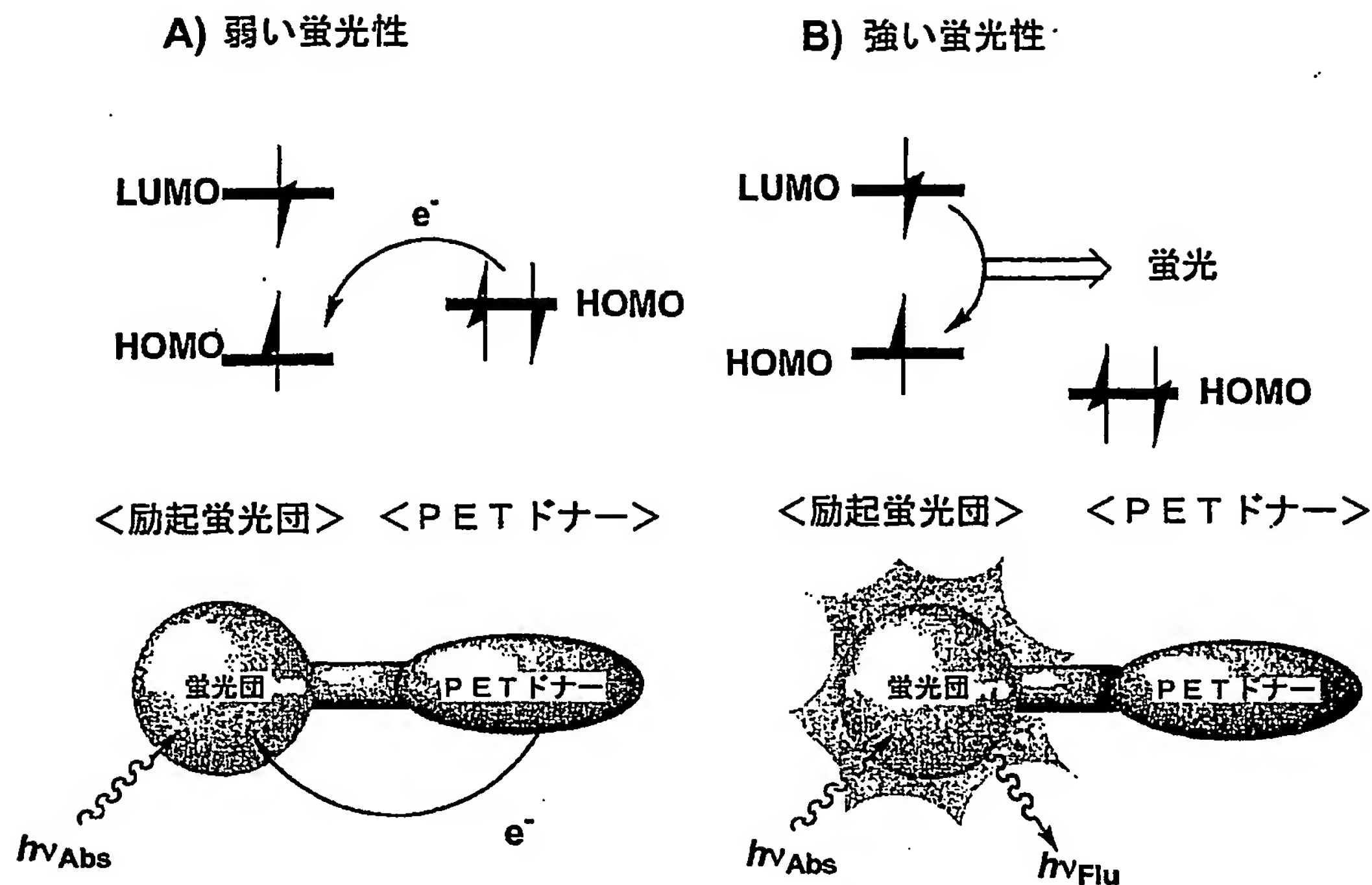


第2図

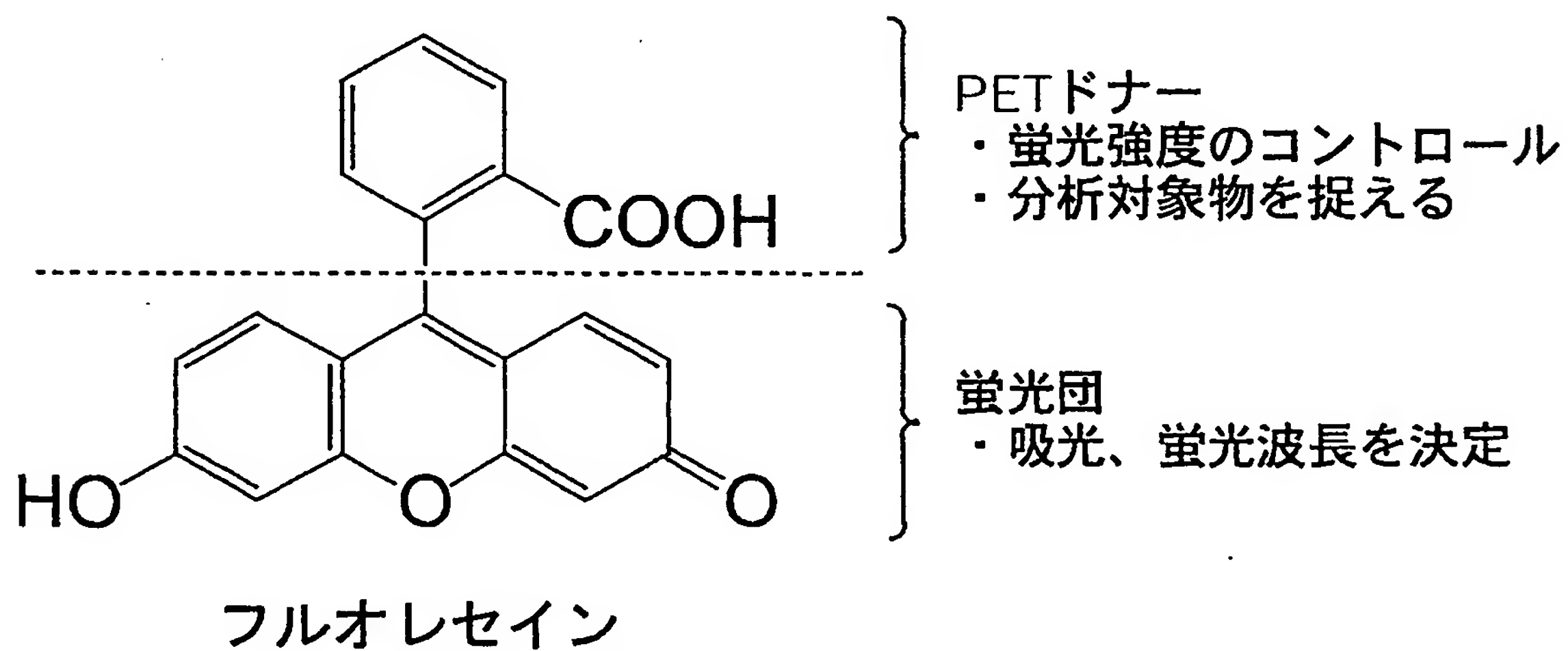


HOMOエネルギー (B3LYP/6-31G(d), eV)

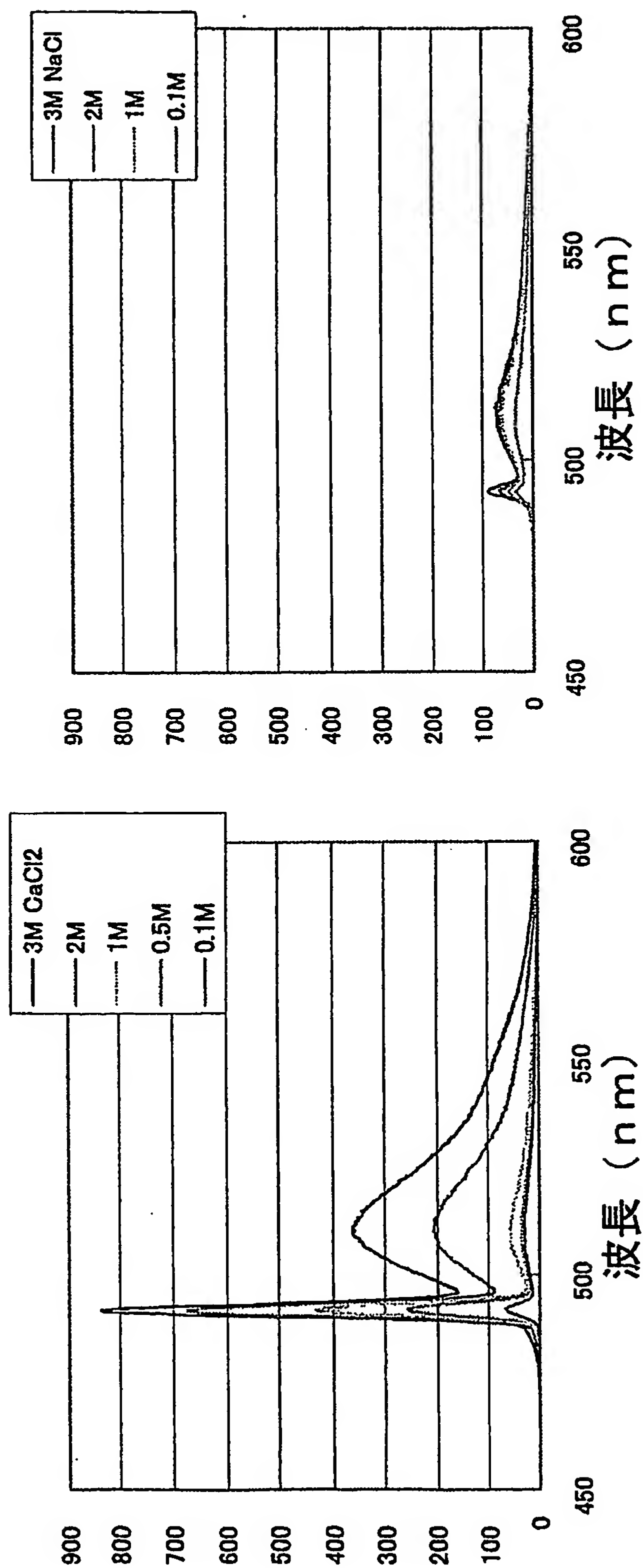
第3図



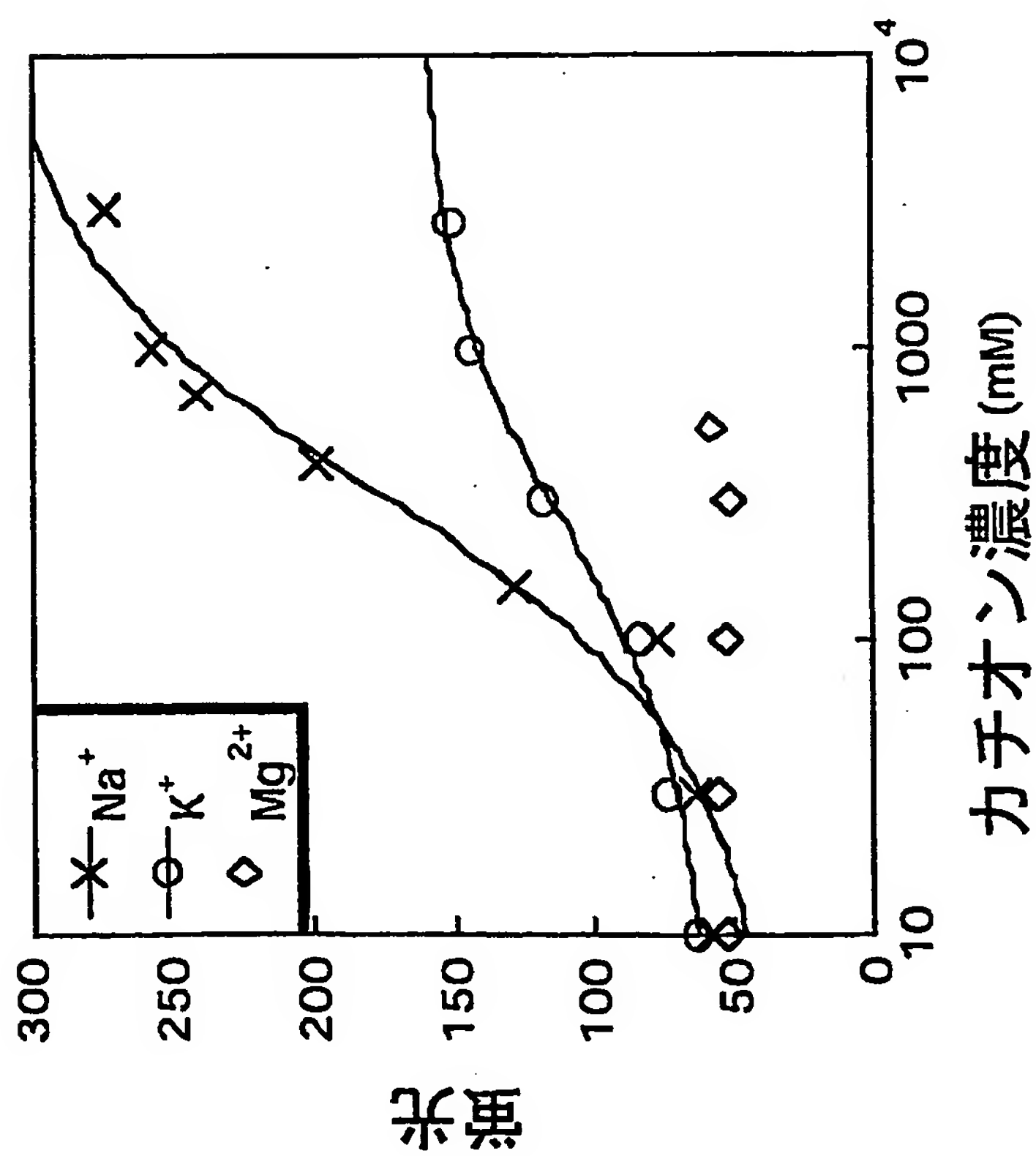
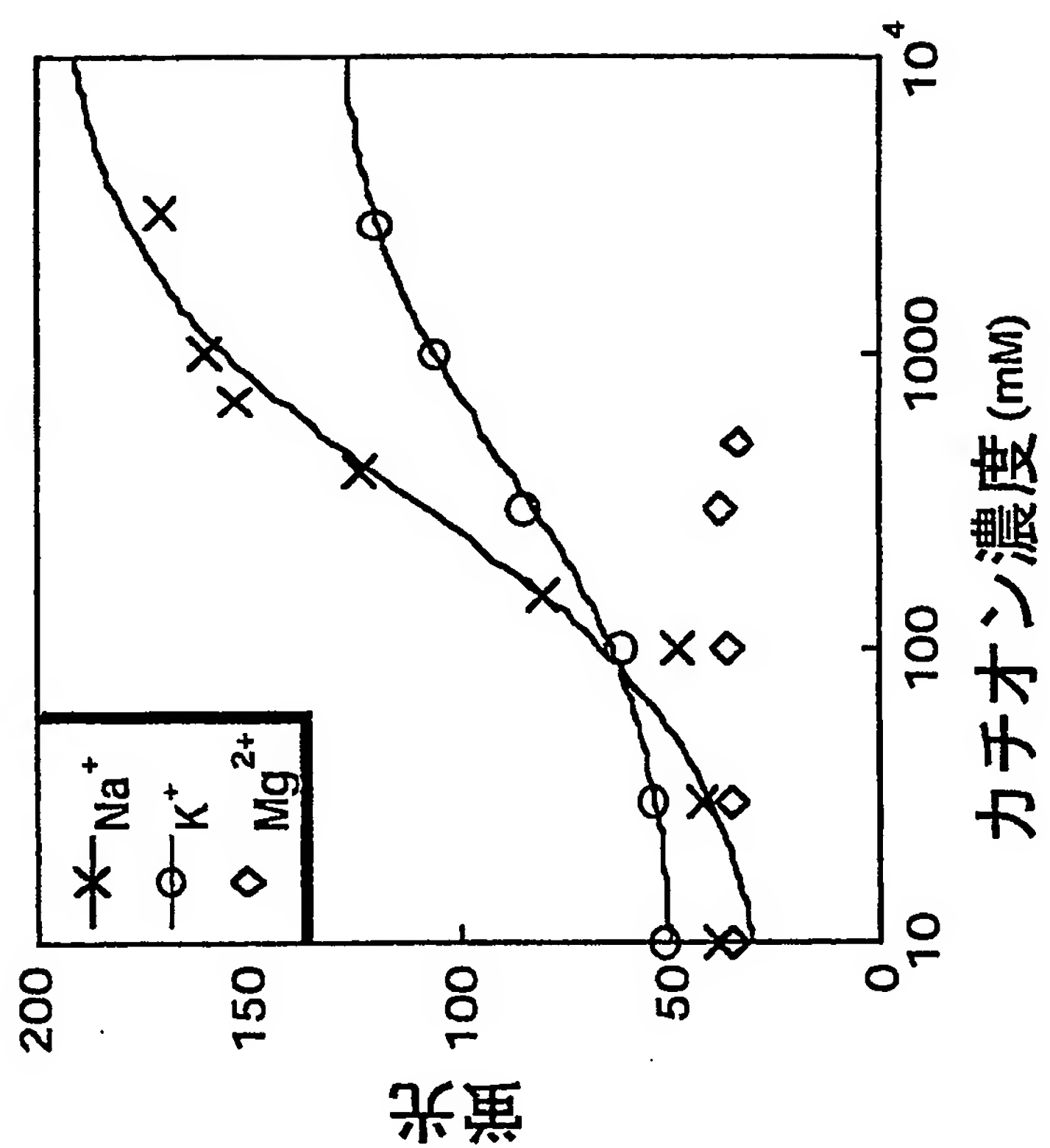
PETの概念図



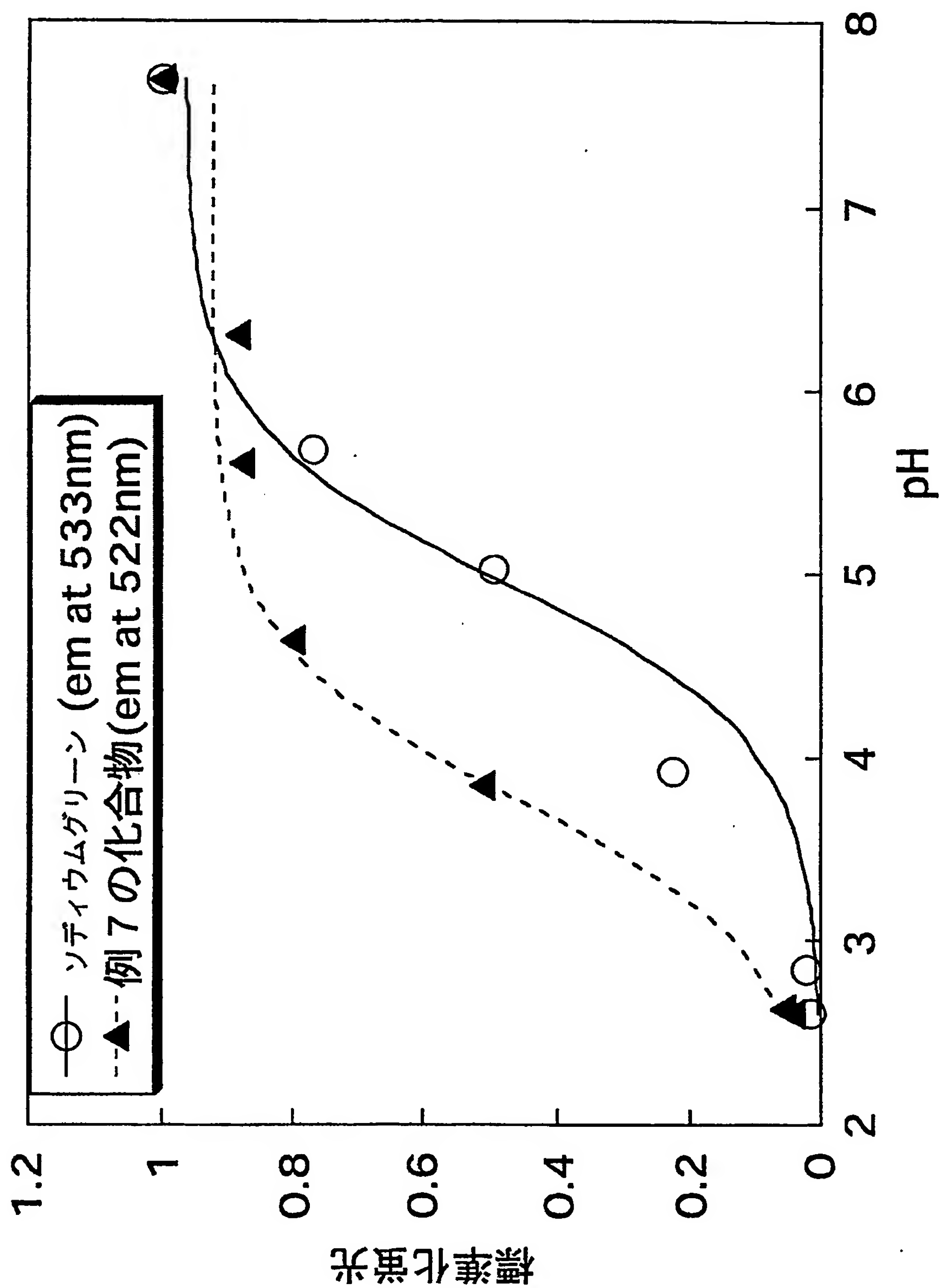
第4図



第5図



第6図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N31/00, G01N21/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N31/00, G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-207112 A (Becton Dickinson and Co.), 26 July, 1994 (26.07.94), & DE 69314115 C & CA 2099922 A & EP 582836 A & US 5302731 A & US 5380880 A & US 5393514 A	1-10
A	JP 10-226688 A (Tetsuo NAGANO), 25 August, 1998 (25.08.98), (Family: none)	1-10
A	JP 8-271430 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 18 October, 1996 (18.10.96), (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 October, 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 G01N31/00, G01N21/78		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. 7 G01N31/00, G01N21/78		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年		
日本国公開実用新案公報 1971-2003年		
日本国登録実用新案公報 1994-2003年		
日本国実用新案登録公報 1996-2003年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 6-207112 A (ベクトン・ディッキンソン・アンド ・カンパニー) 1994. 07. 26 & DE 69314115 C & CA 2099922 A & EP 582836 A & US 5302731 A & US 5380880 A & US 5393514 A	1-10
A	JP 10-226688 A (長野哲雄) 1998. 08. 25 (ファミリーなし)	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献		
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献		
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの		
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの		
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07. 10. 03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先		2J 9507
日本国特許庁 (ISA/JPO)		特許庁審査官 (権限のある職員)
郵便番号100-8915		竹中 靖典
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-271430 A (アイシン精機株式会社) 1996. 10. 18 (ファミリーなし)	1-10